

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame ETIENNE née PETITFILS Jacqueline



1^{re} Thèse. — La choline, la bétaine, les lipides chez *Patella vulgata*.

2^e Thèse. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 12 Juin 1956, devant la Commission d'examen.

MM. FROMAGEOT, Président.

CHAMPETIER, }

M^{lle} LE BRETON, }

Examineurs.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552424_0004

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Madame ETIENNE née PETITFILS Jacqueline



1^{re} Thèse. — La choline, la bétaine, les lipides chez *Patella vulgata*.

2^e Thèse. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 12 Juin 1956, devant la Commission d'examen.

MM. FROMAGEOT, Président.

CHAMPETIER, }
M^{lle} LE BRETON, } Examineurs.

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PERES

G. JULIA	T Anal. sup. et Algèbre sup.	DANJON	T Astronomie.
E. DARMOIS	T Enseignement de Physique.	FROMAGEOT	T Chimie biologique.
FOCH	T Méc. phys. et expérimentale.	LAPORTE	T Phys. génér. et radioactivité.
PAUTHENIER	T Electrotechnique générale.	JANET	T Méc. anal. et Méc. céleste.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	PETTIT	T Biologie maritime.
JOB	T Chimie générale.	QUENEY	T Météor. et dyn. atmosphér.
PRENANT	T Anatomie et Histol. comparées.	GALLIEN	T Embryologie.
GARNIER	T Géométrie supérieure.	EICHHORN	T Biologie végétale (P.C.B.).
PERES	T Mécanique des fluides et appl.	DE CUGNAC	Biologie végétale (P.C.B.).
LAUGIER	T Physiologie générale.	M^{lle} CAUCHOIS	T Chimie physique.
M. CURIE	T Physique (P.C.B.).	THELLIER	T Physique du Globe.
BARRABE	T Géol. struct. et Géol. appliquée.	AUDUBERT	T Electrochimie.
G. DARMOIS	T Calc. des prob. et Phys. math.	L'HERITIER	T Génétique.
J. BOURCART	T Géogr. Phys. et Géol. dynam.	GRIVET	T Radioélectricité.
PLANTEFOL	T Botanique.	PONCIN	T Mécanique des fluides.
GRASSE	T Evol. des êtres organisés.	THIRY	T Mécanique appliquée.
PREVOST	T Chimie organique.	DUBREIL	T Arith. et théor. des nombres.
BOULIGAND	T Appl. de l'analyse à la Géom.	QUELET	T Chimie organique.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
WYART	T Minéralogie.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
TEISSIER	T Zoologie.	CUVILLIER	T Géol. struct. et Géol. appl.
MANGENOT	T Biologie végétale.	JUNG	T Pétrographie.
P. AUGER	T Physique quantique et Relat.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électron.
MONNIER	T Physiologie des fonctions.	WIEMANN	T Chimie organ. structurale.
PIVETEAU	T Géologie.	JACQUINOT	T Spectrosc. et Phys. céleste.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	VASSY	Physique de l'atmosphère.
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	DESTOUCHES	Théories physiques.
LAFFITTE	T Chimie générale.	M. PRUVOST	T Géologie.
FAVARD	T Mécanique générale.	AMIEL	T Chimie (P.C.B.).
COULOMB	T Physique du Globe.	HOCART	T Minéralogie.
M^{lle} COUSIN	T Biologie animale (P.C.B.).	J.P. MATHIEU	T Physique (P.C.B.).
CHRETIEN	T Chimie minérale.	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
P. DRACH	T Zoologie.	MAY	Biologie animale (P.C.B.).
KASTLER	T Physique.	CHOQUET	T Calc. diff. et intégral.
EPHRUSSI	T Génétique.	FELDMANN	Biologie (P.C.B.).
WURMSER	T Biol. physico-chimique.	GUINIER	T Physique (P.C.B.).
RIVIERE	T Géologie (S.P.C.N.).	JOST	T Biologie (P.C.B.).
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.).	FORTET	T Calc. des probabilités.
LUCAS	T Recherches physiques.	SCHWARTZ	T Méth. mathém. de la Phys.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
ARNULF	T Optique appliquée.	MALAVARD	T Aviation.
M. MORAND	T Physique.	BRELOT	T Calcul différentiel.
SOLEILLET	T Physique.	NORMANT	T Chimie (P.C.B.).
FORTIER	T Méc. expér. des fluides.	BENARD	T Chimie (P.C.B.).

BUVAT T Botanique (E.N.S.).
DUGUE T Statistiques mathématiques.
GELOSO Chimie (S.P.C.N.).
SOULAIRAC T Psychophysiologie.
ULRICH T Physiologie végétale.
MARECHAL T Optique théor. et appl.
KIRRMANN T Théories chimiques.
CHADEFAUD Botanique.
DESTRIAU Physique (M.P.C.).
M^{ne} LE BRETON Physiologie générale.
SALEM Mathématiques générales.
LELONG T Mathématiques générales.

DEVILLERS Anat. et Histol. comparées.
EHRESMANN T Topologie algébrique.
FRANÇON Physique (M.P.C.).
GLANGEAUD T Géographie phys. et Géologie dyn.
GOCHMENT T Mathématiques (M.P.C.).
PYSOT T Calcul des probabilités.
ROCH (E) Géologie.
SCHATZMANN Astrophysique.
TERMIER T Paléontologie stratigraphique.
ZAMANSKY T Mathématiques générales.
JOLIOT T Physique nucléaire et radioactivité.

Secrétaire général **C. MONIER**

A Monsieur le Professeur Ernest KAHANE,

en témoignage de ma reconnaissance
pour les précieux conseils qu'il
m'a prodigués et qui m'ont permis
de mener à bien ce travail.

A mes Parents,

A mon l'ari,

INTRODUCTION

En 1849, STRECKER (83) découvre dans la bile de porc un nouveau principe azoté, appelé plus tard choline et que de nombreux auteurs isolent les années suivantes de matériels végétaux et animaux extrêmement variés. En 1910, GAUTRELET (33) montre que Vertébrés et Invertébrés se différencient par l'absence de choline libre dans ceux-ci et que notamment Mollusques et Crustacés en sont complètement dépourvus. Avec des techniques améliorées, il reprend son étude systématique avec CARAYON-GENTIL en 1938 (15) et il conclut que certains Invertébrés contiennent des traces de choline libre mais que seuls les Vers et les Crustacés en renferment plus de 10 Y par gramme.

Dans le cadre de leurs recherches sur la Biochimie de la choline et de ses dérivés en 1938, E. KAHANE et J. LEVY (48) mettent au point des techniques analytiques sûres et commodes qui leur permettent de constater qu'un Gastéropode, *Patella Vulgata* (Linné 1758), contient la quantité inattendue de 2mg par g. (calculée en choline) d'un précurseur de la choline analogue à celui du sperme et capable comme lui de libérer de la choline par action enzymatique ou par hydrolyse acide et alcaline et qu'ils appellent provisoirement "choline hydrosoluble combinée". Une teneur aussi élevée est exceptionnelle : les deux auteurs ont examiné de nombreux échantillons d'Invertébrés et seule la Patelle s'est révélée une telle source de choline hydrosoluble combinée ; de tous les matériels animaux et végétaux analysés, seul le sperme en contient une quantité supérieure (31) (43). Les techniques utilisées éliminent tout risque de dégradation autolytique et cette choline hydrosoluble combinée existe à l'état naturel dans les tissus de la Patelle ; elle ne résulte pas d'un artefact. Le terme "choline hydrosoluble combinée" peut désigner un seul ester de la choline, mais il peut également en désigner plusieurs : phosphorique, glycérophosphorique, sulfurique, etc... Dans certains cas, la choline hydrosoluble combinée est assimilée à la glycérylphosphorylcholine et c'est ainsi que SCHMIDT, THANNHAUSER et leurs collaborateurs (79) montrent que dans le pancréas de boeuf autolysé la choline hydrosoluble combinée

est de la glycérylphosphorylcholine. Plus récemment Marthe DIAMENT (23) fait une identification analogue pour le foie d'agneau, les vésicules séminales de rat et le sperme dans lequel elle isole également de la phosphorylcholine.

Nous nous sommes proposés d'identifier la choline hydrosoluble combinée de la Patelle.

o o

Les conditions de vie et de reproduction de la Patelle ont été souvent observées et dès 1896, GEMMILL (34) étudie ses phénomènes sexuels ; par contre, il semble que cet animal ait peu tenté les biochimistes ; ces dernières années cependant, certains auteurs se sont intéressés à quelques-uns de ses constituants. Ce n'est qu'en 1937 que ROSEN (76) fait l'étude comparée des protéinases de l'intestin. L'année suivante, WILHELM (89) montre qu'il y a une relation entre le métabolisme du calcium de la Patelle et sa respiration. Plus tard, MILLER (65) dose les vitamines A et D dans l'intestin et l'hépatopancréas, tandis que HIRSH (39) étudie les variations de l'acide chondroïtine - sulfurique dans certains cas pathologiques. HULTIN (40) isole des tissus de l'animal des protéines basiques sous forme de sulfate et GOODWIN (35) dose les caroténoïdes des gonades. De la poudre purifiée des viscères, DODGSON (24) extrait des arylsulfatases et des glucuronidases ; tout récemment enfin, RANZOLI (72) observe qu'il y a formation et accumulation des nucléoprotéïnes dans les nucléoles et dans le cytoplasme au cours de l'ovogénèse. Mais en fait, il n'y a pas eu de recherches suivies sur la Patelle et KAHANE et LEVY n'y avaient vu qu'une source de matière première ; cependant la Patelle est un sujet d'étude qui présente certaines particularités intéressantes ; nous en avons mis quelques-unes en évidence et nous nous proposons de les étudier plus en détail dans l'avenir pour en saisir les mécanismes.

o o

Pour identifier la choline hydrosoluble combinée de la Patelle, comme

nous nous proposons de le faire, nous n'avons pas utilisé les procédés d'isolement et de purification décrits par les auteurs déjà cités : l'extrait aqueux déféqué de la Patelle est riche en matières azotées qui s'éliminent difficilement et qui perturbent les réactions de précipitation. C'est par une autre voie que nous montrons l'identité de la choline hydrosoluble combinée et de la glycérylphosphorylcholine.

Nous avons en outre observé que la Patelle est riche en une substance que nous avons identifiée à la bétaine.

Par action d'enzymes endogènes et exogènes les phosphoaminolipides libèrent facilement de la glycérylphosphorylcholine ; il nous a donc semblé vraisemblable que cette dernière puisse jouer un rôle soit dans la synthèse, soit dans la dégradation des lécithines, et qu'elle soit liée au métabolisme des lipides ; nous avons étudié la composition de ceux-ci.

En opérant sur des lots de Patelles variés, nous avons observé que le taux de choline hydrosoluble combinée n'est pas constant au cours de l'année et nous mettons en évidence un cycle annuel de la glycérylphosphorylcholine, alors que le taux de la bétaine et celui des lipides reste constant. Mais nous ne pouvons émettre que des hypothèses quant aux causes de ces variations, car il est difficile de faire un élevage de Patelles, celui-ci étant soumis à des conditions extérieures qui ne peuvent être reproduites dans notre laboratoire : marée, état hygrosopique de l'atmosphère, température de l'eau et de l'air, richesse en matières organiques, etc... Nos expériences portent donc sur des animaux ayant eu des conditions de vie aussi identiques que possible et les seuls facteurs dont nous observons la variation sont le lieu de récolte, la saison et la température.

Nous exposerons successivement nos recherches

- 1°) Sur l'identification de la choline hydrosoluble combinée à la glycérylphosphorylcholine.
- 2°) Sur l'isolement et l'identification de la bétaine.
- 3°) Sur les substances lipidiques de la Patelle.

4°) Sur les variations saisonnières de ces constituants.

Nous remercions les Professeurs Claude FROMAGEOT, Georges CHAMPETIER, et Eliane LE BRETON qui ont accepté de juger notre travail et nous les remercions pour leur bienveillante indulgence.

PREMIER CHAPITRE

IDENTIFICATION DE LA CHOLINE HYDROSOLUBLE COMBINÉE DE LA PATELLE

I. HISTORIQUE.

E. KAHANE et J. LEVY (45) au cours de toute une série de travaux sur la Biochimie de la choline et de ses dérivés, observent la présence dans la plupart des organes et tissus examinés, d'un précurseur de la choline qu'ils appellent "choline hydrosoluble combinée", qui libère de la choline soit par dégradation enzymatique, soit par hydrolyse acide ou alcaline. Ils cherchent un matériel susceptible d'être une source abondante de ce principe, afin de faire l'étude de ses propriétés et de l'identifier. Après avoir analysé des extraits de nombreux Invertébrés, ils trouvent en 1938, dans Patella Vulgata, une quantité de choline hydrosoluble combinée voisine de 2mg par g d'animal (en ion-choline) (48).

Ils préparent en 1939 un stock de choline hydrosoluble combinée de plus de 100 g à partir de 76 kg de Patelles et ils tentent de le purifier (49). Ils appliquent aux extraits des séries de précipitations par l'acétone suivies de reprises par les alcools méthylique et éthylique, ainsi que des adsorptions sur gel de silice, lévillite, actigel et permutite, suivies d'élutions, sans résultat. Ces opérations répétées épuisent leur stock de choline hydrosoluble combinée et les événements de 1939-1945 les empêchent de le renouveler ; ils laissent le problème en suspens.

Quelques années plus tard, d'autres auteurs étudient dans divers tissus les précurseurs hydrosolubles de la choline et plusieurs travaux mentionnent des techniques permettant la purification d'extraits de foie et de pancréas, notamment l'isolement de la glycérylphosphorylcholine. L'étude critique de ces travaux a été faite par Marthe DIAMENT, E. KAHANE et J. LEVY (22) ; citons ceux de SCHMIDT TANNHAUSER et leurs collaborateurs (7) comme les plus significatifs. Dans notre laboratoire, Marthe DIAMENT (23) a consacré une partie de sa thèse à l'identification de la choline hydrosoluble combinée du pancréas de boeuf, des vésicules séminales du rat et du sperme de diverses espèces.

Malheureusement, les méthodes décrites jusqu'ici ne donnent pas de résultats satisfaisants dans le cas de la Patelle, car les extraits aqueux de cet animal sont très riches en matières azotées hydrosolubles et le restent quelles que soient les méthodes de défécation utilisées.

Après l'essai infructueux de divers procédés de purification, nous avons réussi à obtenir une solution contenant la choline hydrosoluble combinée à peu près pure, en revenant aux adsorptions sur actigel d'une solution aqueuse et élu-tions à l'eau bouillante, de E. KAHANE et J. LEVY, en répétant cette opération avec persévérance.

L'étude de cette solution nous a permis d'identifier la choline hydrosoluble combinée de la Patelle à la glycérylphosphorylcholine.

Notre étude de la choline hydrosoluble combinée de la Patelle, comporte donc deux parties :

- 1°- sa purification
- 2°- son identification.

II. TECHNIQUES UTILISEES.

1°. Préparation de l'extrait aqueux déféqué de Patelles.

Pour préparer l'extrait aqueux de Patelles nous utilisons la technique de défécation par l'hydroxyde de fer naissant (LUNEAU (60) ; E. KAHANE et J. LEVY (48).) : une solution de sulfate ferrique à 50 p. 100 et un excès de carbonate de calcium donnent de l'hydroxyde ferrique, du gaz carbonique et du sulfate de calcium peu soluble. Cette opération, comme nous l'avons déjà montré (50) évite toute dégradation autolytique des tissus et permet d'obtenir une solution neutre (pH 7,2) limpide, peu colorée, pauvre en sels, se prêtant bien à la plupart des dosages qui nous intéressent.

Mode opératoire.

Après avoir pesé les Patelles débarrassées de leurs coquilles, nous les broyons dans le bol d'un Turmix en présence d'une solution de sulfate ferrique à 50 p. 100, à raison de 4 cm³ de réactif par g d'organe ; le broyat est neutralisé par 1,5 g de carbonate de calcium par cm³ de solution ferrique et porté à

l'ébullition. Nous essorons sur Buchner, nous lavons deux fois le précipité par remise en suspension dans l'eau bouillante, suivie d'essorage. Le filtrat et les eaux de lavage réunis sont concentrés et filtrés à nouveau pour éliminer la partie de sulfate de calcium qui s'est déposée au cours de l'évaporation.

2°. Dosage de l'azote.

Nous dosons l'azote après minéralisation par l'acide sulfurique, en présence de catalyseurs (sulfate de cuivre et sulfate de potassium), par la microméthode de Kjeldahl.

3°. Dosage du phosphore.

Après minéralisation par attaque nitroperchlorique, nous dosons le phosphore par évaluation au diffusio-absorptiomètre de Dognon, de la coloration jaune obtenue en milieu acide, par addition de vanadate et de molybdate d'ammonium, d'après MISSON (66).

4°. Dosage de la choline hydrosoluble combinée.

La choline libre est dosée sous forme de periodure, mais la choline hydrosoluble combinée ne précipite pas avec le réactif iodo-ioduré (48). Pour doser celle-ci, nous devons libérer la choline de son ester et ultérieurement, précipiter un periodure.

Le dosage de la choline hydrosoluble combinée se ramène donc à un dosage de choline libre.

Cette opération se fait en trois temps :

- a) hydrolyse de la choline hydrosoluble combinée
- b) purification au moyen du sel de Reinecke
- c) précipitation du periodure et dosage.

a) Hydrolyse de la choline hydrosoluble combinée.

Nous hydrolysons 5 cm³ d'extrait aqueux déféqué correspondant environ à 1mg de choline hydrosoluble combinée, par 5 cm³ d'acide nitrique à 20 p. 100 en fiole à acétylation pendant trois heures, à l'ébullition. C'est sur l'hydrolysate neutralisé et déféqué par l'hydroxyde ferrique que nous dosons la choline.

b) Purification et isolement par le sel de Reinecke.

La précipitation du periodure ne peut se faire directement dans le milieu précédent parce qu'il contient des substances qui perturbent la réaction en surchargeant le periodure de choline. Nous précipitons la choline libre sous forme de Reineckate ; c'est une méthode satisfaisante parce qu'elle permet une bonne séparation de la choline et de la plupart des substances qui l'accompagnent (15).

Mode opératoire.

A 1 ou 2 cm³ d'une solution aqueuse renfermant de 0,5 à 1 mg de choline libre, nous ajoutons un volume égal d'une solution saturée à froid (2 p. 100 environ) fraîchement préparée d'une solution de reineckate d'ammonium, ou sel de Reinecke $[\text{Cr}(\text{SCN})_4(\text{NH}_3)_2]\text{NH}_4$, H₂O - Il se forme peu à peu un précipité rose chatoyant que nous centrifugeons après un séjour d'une heure en glacière ; nous lavons une fois par 1 ou 2 cm³ d'eau distillée glacée, suivant l'importance du précipité. Celui-ci contient la totalité de la choline libre de l'échantillon.

c) Précipitation du périodure.

La choline est dosée sous forme de periodure, suivant la technique mise au point par DUCET et KAHANE (25). Une solution de sel de choline additionnée de réactif iodo-ioduré, précipite un enneaiodure dont les 8 atomes d'iode libre sont titrés par l'hyposulfite de sodium N°50.

Mode opératoire.

Le précipité de reineckate est dissous à chaud dans 2 cm³ de citrate de sodium ou d'ammonium à 5 p. 100. Ce traitement détruit le reineckate sans précipitation de l'hydroxyde de chrome et crée un milieu favorable à la précipitation du périodure. La solution refroidie est amenée à 5 cm³ et nous ajoutons 1,5 cm³ de réactif iodo-ioduré ainsi préparé :

iode	:	16 g
iodure de potassium	:	24 g
eau en quantité suffisante pour		100 cm ³

Après un séjour de 1 h. 30 en glacière, nous centrifugeons le précipité et nous lavons deux fois par 2 cm³ d'eau glacée, par décantation, sans mise en suspension du précipité. Nous le dissolvons ensuite dans l'alcool et nous titrons

l'iode libre par l'hyposulfite de sodium N|50. Comme 8 atomes d'iode correspondent à 1 choline, $1 \text{ cm}^3 \text{ S}_2\text{O}_3 \text{ Na}_2 \text{ N|50}$ correspond à 0,260 mg de choline.

Nous exprimons les résultats de choline en ion cholinium :



III. LA CHOLINE HYDROSOLUBLE DE LA PATELLE EST UN ESTER DE LA CHOLINE.

Le principe trouvé en abondance dans la Patelle par E. KAHANE et J. LEVY (48) est-il réellement un ester de la choline ? Ils dosent cette choline hydrosoluble combinée, après hydrolyse acide ou alcaline, par la méthode de dilution limite de précipitation du periodure de la choline. L'aspect du précipité, en parallélogrammes allongés, brun très foncé, reconnaissables au microscope, n'est pas spécifique de la choline ; la bétaine, l'aldéhyde bétaine, l'oxyde de triméthylamine donnent un précipité analogue dans des conditions identiques. Les dosages biologiques effectués concurremment aux dosages chimiques et l'accord des résultats ne suffisent pas à identifier la choline.

Nous vérifions tout d'abord que par hydrolyse acide, la "choline hydrosoluble combinée" libère une base que nous identifions à la choline par son comportement vis-à-vis de l'oxydation manganique alcaline, par la calcination de son phosphotungstate, par chromatographie et par électrophorèse.

Nous hydrolysons par l'acide nitrique l'extrait aqueux de Patelles renfermant la choline hydrosoluble combinée, en opérant suivant les conditions déjà décrites. Nous isolons la base libérée sous forme de reineckate, ce qui permet une purification de la substance et procure une matière première facilement utilisable et de conservation aisée.

1°. Oxydation manganique acide.

COTTE et KAHANE (18) puis KAHANE et SIMENAUER (51), ont fait une mise au point de l'oxydation permanganique, et de l'oxydation manganique alcaline de la choline et de ses dérivés. Dans des conditions favorables, la choline fournit quantitativement de la triméthylamine, qu'il est facile de séparer des autres bases distillables, par entraînement en présence d'aldéhyde formique.

Nous soumettons une portion de reineckate de la base à l'oxydation man-
ganique alcaline et nous observons que la substance se transforme quantitativement
en triméthylamine

44,05 mg de reineckate $\longrightarrow$ 2,00 cm³ SO₄H₂ N|50, soit 13,7 % N $\equiv$ (CH₃)₃
fournis par le reineckate. Calculé pour le reineckate de choline 13,9 %.

2°. Calcination du phosphotungstate.

Les sels de choline en solution aqueuse, précipitent par addition d'a-
cide phosphotungstique, un phosphotungstate de choline :

12 WO₃ PO₄ | N (CH₃)₃ C₂H₄OH |₃, anhydre, bien défini, ayant une composition cons-
tante dans les conditions les plus variées (43). Sa calcination laisse un résidu
d'anhydride phosphotungstique, 12 WO₃ PO₃ H, et le rapport poids anhydride | poids
de phosphotungstate est de 89,7.

Mode opératoire.

Avant de précipiter la base isolée sous forme de phosphotungstate, nous
devons transformer son reineckate en chlorure. Nous opérons comme KAPFHAMMER et
BISCHOFF (52) l'ont décrit.

Une portion de reineckate est dissoute dans le minimum d'eau et traitée
par un excès d'une solution de sulfate d'argent de titre connu. Le reineckate d'
argent qui précipite quantitativement est éliminé par filtration. Le filtrat est
additionné d'une quantité de chlorure de baryum moléculairement équivalente au
sulfate d'argent employé. La liqueur filtrée est une solution de chlorure, exemp-
te d'argent et de baryum.

Nous portons cette solution à l'ébullition et nous ajoutons par petites
quantités une solution d'acide phosphotungstique à 10 p. 100. Il se forme un pré-
cipité blanc de phosphotungstate ; nous vérifions qu'une nouvelle addition de réac-
tif ne donne plus de précipité. Après avoir abandonné quelques heures en glacière,
nous centrifugeons, nous lavons par un peu d'eau glacée et nous desséchons le
phosphotungstate sous vide sulfurique. Il se présente sous forme d'une poudre
blanche bien sèche, dont nous pesons une vingtaine de mg dans un creuset de pla-
tine. Nous portons doucement au rouge ; après quelques minutes, nous laissons re-
froidir et nous pesons le résidu.

Résultats obtenus.

15,46 mg de phosphotungstate fournissent 13,85 mg d'anhydride, soit 89,6 %₁₀₀. Calculé pour le phosphotungstate de choline, 89,7 %₁₀₀.

3°. Chromatographie et électrophorèse.

Nous identifions la base à la choline par chromatographie et par électrophorèse, au cours des mêmes opérations d'identification de la choline hydrosoluble combinée, dont la description se trouve ci-après.

En résumé, la base libérée dans l'hydrolyse de la "choline hydrosoluble combinée" est bien de la choline, d'après l'oxydation manganique alcaline, la calcination du phosphotungstate, la chromatographie et l'électrophorèse.

IV. PURIFICATION DE LA CHOLINE HYDROSOLUBLE COMBINÉE.

La choline hydrosoluble combinée extraite de la Patelle existe à l'état naturel dans les tissus ; nous avons précédemment montré que les conditions de défécation par l'hydroxyde de fer éliminent tout risque de dégradation autolytique (59) ; nous avons également mis en évidence la pauvreté des tissus de la Patelle en estérases capables de libérer de la choline hydrosoluble combinée aux dépens des lécithines (27).

Pour définir la pureté de l'extrait, nous utilisons le rapport de l'azote total à l'azote de la choline hydrosoluble combinée, $N|CHC$; il est égal à l'unité dans un extrait ne contenant que de la choline hydrosoluble combinée.

Les extraits aqueux déféqués de Patelles contiennent une quantité à peu près constante d'azote, comprise entre 2 et 3 mg par g d'animal sans coquille, mais le rapport $N|CHC$ varie avec les échantillons de 15 à 100. Nos essais de purification ne portent naturellement que sur des échantillons dont le rapport $N|CHC$ est le plus faible possible.

1°. Nature des substances azotées.

Nous cherchons tout d'abord à connaître la nature des substances azotées qui accompagnent la choline hydrosoluble combinée dans l'extrait aqueux

déféqué de Patelles. Un essai préalable à la ninhydrine est positif : il y a donc des groupements aminés libres (16) ; dès 1913 SUZUCKI (84) notait la richesse des extraits de Mollusques et de Poissons en acides aminés.

Pour avoir une estimation approximative des groupements aminés, nous appliquons la méthode de SÖRENSEN.

Malgré l'imprécision de ce dosage : point final du titrage indécis, résultat trop faible pour un grand nombre d'acides aminés et trop élevé pour d'autres, nous constatons que la presque totalité des substances azotées qui accompagnent la choline hydrosoluble combinée sont des composés aminés ; en effet, le rapport nombre d'atomes d'azote aminé | nombre d'atomes d'azote de la choline hydrosoluble combinée est voisin de 13.

2°. Essais de purification par différents sulfates métalliques.

- Sulfate ferrique : La défécation ferrique qui permet d'obtenir un extrait grandement purifié par rapport au matériel initial, est insuffisante dans ce cas. BOULAKIA et KAHANE (9) observent que des traitements successifs par l'hydroxyde de fer purifient encore le milieu.

Si nous soumettons un premier extrait déféqué dont le rapport $N|CHC$ est voisin de 15 à une seconde défécation, ce rapport n'est plus que de 11 ; mais cinq opérations analogues n'apportent aucune amélioration ultérieure.

- Autres sulfates métalliques : Nos essais de purification par le sulfate de cuivre et le sulfate de mercure ne donnent pas de résultats satisfaisants : dans le meilleur des cas, le rapport $N|CHC$ est égal à 10.

Nous abandonnons ces techniques de purification qui sont insuffisantes.

3°. Isolement de la choline hydrosoluble combinée sous forme de ferrichlorure.

Marthe DIAMENT (23) identifie la choline hydrosoluble combinée dans différents matériels sous forme de ferrichlorure. Nous tentons d'appliquer cette méthode à l'extrait de Patelles. Après avoir dissous dans le méthanol le résidu d'évaporation d'un extrait aqueux de Patelles, nous précipitons un ferrichlorure par addition de chlorure ferrique, d'acétone et d'acide sulfurique en respectant les conditions définies par l'auteur. Nous obtenons un précipité qui contient de la choline hydrosoluble combinée, qui est dépourvu de choline libre mais dont le

rapport $N|CHC$ est voisin de 9. Le rendement n'est que de 0,7 %.

Nous ne pouvons appliquer un tel procédé de purification et d'isolement à la choline hydrosoluble combinée de la Patelle ; le milieu trop souillé d'impuretés est défavorable à la précipitation du complexe ; en outre la purification est insuffisante et la faiblesse du rendement rend impossible la répétition des opérations.

4°. Utilisation d'une solution de sel de Reinecke.

Outre la choline hydrosoluble combinée, l'extrait aqueux déféqué de Patelles renferme de faibles quantités de choline libre. La choline hydrosoluble combinée est difficile à isoler parce que rares sont les réactifs susceptibles de la précipiter. C'est ainsi que E. KAHANE et J. LEVY (48) la séparent de la choline libre en précipitant celle-ci sous forme de reineckate : la choline hydrosoluble combinée ne réagit pas avec le reineckate d'ammonium et elle n'est pas entraînée par le reineckate de choline.

Nous tentons de purifier la choline hydrosoluble combinée de la Patelle en additionnant son extrait aqueux d'une solution saturée de sel de Reinecke. En milieu neutre, il y a précipitation de reineckate de choline ; après élimination de ce dernier, si nous alcalinisons les liqueurs-mères par la soude, il n'y a pas de réaction, mais si nous acidifions par l'acide chlorhydrique il se forme un précipité rose violacé, satiné et chatoyant, très abondant ; ce reineckate, que nous identifierons plus tard à celui de bétaine, est totalement dépourvu de choline hydrosoluble combinée. La solution débarrassée de ce précipité doit être partiellement purifiée. Malheureusement ce traitement est inefficace, l'analyse montre que le rapport $N|CHC$ n'a pratiquement pas changé, à cause de la dégradation que subit l'ester de la choline en milieu acide.

5°. Adsorption sur actigel et élution.

Au cours de son travail sur la séparation et le dosage des différentes formes de la choline, DUCET (26) constate qu'en faisant passer une solution aqueuse dépourvue de sels minéraux contenant de la choline libre et de la choline hydrosoluble combinée, sur une colonne d'actigel, la choline libre est entièrement retenue par la colonne, tandis que la choline hydrosoluble combinée reste dans le filtrat.

Cette technique semble répondre à nos besoins parce que susceptible d'isoler la choline hydrosoluble combinée et de la purifier.

Mode opératoire.

L'extrait aqueux de Patelles contient des sels minéraux propres au matériel et ceux apportés par le mode de préparation, le sulfate de calcium notamment. Pour éliminer ces sels, nous faisons plusieurs reprises successives par le méthanol dans lequel la choline hydrosoluble combinée est soluble ; la dernière solution méthanolique est évaporée et le résidu dissous dans l'eau.

Nous prélevons 2 cm³ d'un extrait de Patelles renfermant 4,6 mg de choline hydrosoluble combinée, 3,9 mg de choline libre et 17,6 mg d'azote ; après élimination des sels, nous avons une solution aqueuse d'un volume de 10 cm³.

Nous préparons une colonne de poudre d'actigel en broyant l'actigel du commerce dans un petit moulin électrique, en conservant la fraction qui passe au tamis 80 et en remplissant une colonne de verre de 2,5 cm de diamètre à plaque poreuse en verre fritté G₃, sur une hauteur de 10 cm ; nous lavons cette colonne par 100 cm³ d'eau distillée. Nous passons ensuite les 10 cm³ de l'échantillon, puis à froid de l'eau distillée jusqu'à recueillir 100 cm³ de filtrat.

L'analyse montre que ce liquide, exempt de choline libre et de choline hydrosoluble combinée, renferme 25 % de l'azote total.

Dans la seconde fraction de 100 cm³ recueillie dans les mêmes conditions que la première, nous ne dosons pas de choline libre, mais 0,8 mg de choline hydrosoluble combinée et 1,070 mg d'azote ; le rapport N|CHC est voisin de 11.

En poursuivant l'élution par l'eau bouillante, nous recueillons une solution incolore dépourvue de choline libre, dans laquelle nous dosons 2,4 mg de choline hydrosoluble combinée, soit 50 p. 100 de la quantité primitive et 0,6 mg d'azote ; dans cette fraction le rapport N|CHC est tombé à 1,9.

Résumé.

Par adsorption sur colonne d'actigel d'un extrait de Patelles, nous obtenons après élution à froid, une première portion sans choline libre ou combinée, qui renferme 25% de substances azotées et une seconde fraction qui contient de la choline hydrosoluble ; elle est sans intérêt parce que trop impure.

Par élution ultérieure à chaud, nous recueillons une solution purifiée dont le rapport $N|CHC$ est voisin de 2, sur laquelle nous pouvons tenter d'identifier la choline hydrosoluble combinée.

V. IDENTIFICATION DE LA CHOLINE HYDROSOLUBLE COMBINÉE.

La forme hydrosoluble de la choline chez la Patelle peut soit s'identifier à un seul ester ou en embrasser plusieurs : phosphorique, glycérophosphorique, sulfurique... (79) (23), comme cela a déjà été mis en évidence dans certains tissus. Mais la facilité avec laquelle elle s'hydrolyse et les quantités identiques de choline qu'elle libère dans des conditions variées d'hydrolyse : nitrique, chlorhydrique, barytique sont en faveur de l'hypothèse de son identité avec l'ester glycérophosphorique, le seul qui soit très aisément hydrolysable. En outre, nous observons que le rapport du phosphore total au phosphore de la choline hydrosoluble combinée, $P|CHC$, dans l'extrait aqueux déféqué, est toujours voisin de l'unité, ce qui est en accord avec une forme glycérophosphorique ou phosphorique.

Nous nous proposons de comparer le comportement d'une solution purifiée de choline hydrosoluble combinée de Patelle et de glycérylphosphorylcholine pure vis-à-vis de la chromatographie et de l'électrophorèse. Comme substance témoin, nous utilisons une solution de glycérylphosphorylcholine purifiée, préparée par dégradation alcaline de la lécithine de soja (Marthe DIAMENT).

1°. Chromatographie sur papier.

Si la solution purifiée de la choline hydrosoluble combinée et la solution de glycérylphosphorylcholine ont un comportement identique : même R_F et mêmes réactions colorées vis-à-vis des révélateurs, nous pourrions conclure à l'identité probable des deux principes

MUNIER et MACHEBOEUF (67) définissent les conditions permettant une bonne séparation des ammonium quaternaires ; Marthe DIAMENT (23), s'inspirant de leurs travaux, opère avec un mélange solvant soit alcalin, soit acide saturé d'eau, en phase descendante.

Nous utilisons un système solvant acide, en phase ascendante, mise au

point par AUGUSTINSON (2), en raison de la simplicité de la méthode et de la séparation satisfaisante des différentes substances triméthylammonnées qu'elle permet : choline, bétaine, glycérylphorylcholine.

Technique de la chromatographie sur papier -

a) phase solvante descendante.

Nous utilisons la technique décrite par MUNIER (68).

Une cuve en polyéthylène contenant la phase mobile est placée dans une enceinte étanche constituée par la superposition de 2 récipients cylindriques (diamètre : 19,6 cm ; hauteur : 40 cm) fermés par une bande de chatterton. Le papier (papier Durieux) baigne dans le solvant mobile par son bord supérieur ; le solvant progresse dans le papier par capillarité jusqu'au bas de la feuille. Nous utilisons un rectangle de papier de 22 cm de largeur et de 50 cm de longueur, dont le bord inférieur est découpé en dents de scie de 1 cm de largeur, pour faciliter l'écoulement du solvant.

Nous déposons à l'aide d'un tube capillaire des gouttes de $0,02 \text{ cm}^3$ environ, distantes l'une de l'autre de 2,5 cm, sur une ligne droite, parallèle au bord du papier et distante de celui-ci de 5 cm.

b) phase solvante ascendante.

Nous utilisons les mêmes récipients cylindriques superposés mais nous remplissons le récipient inférieur de la phase mobile sur une hauteur de 1 cm environ.

Nous déposons les gouttes sur une ligne parallèle au bord d'un rectangle de papier de 35 cm de large et 40 cm de haut, que nous roulons de manière à ce que les bords ne se superposent pas.

Systèmes solvants -

En phase alcaline, nous utilisons le mélange propanol - ammoniaque - eau (6-3-1) et en phase acide le mélange butanol - éthanol - acide acétique - eau (8-2-1-3) (4). Ces mélanges présentent l'avantage de se préparer instantanément, sans avoir besoin d'éliminer de phase aqueuse et permettent une séparation satisfaisante des spots des substances qui nous intéressent.

Révélation des spots -

Après passage de la phase solvante, le chromatogramme est séché pendant 5 minutes à l'étuve à 100°, puis plongé dans un bain d'une solution de Dragendorff, modifiée par BREGOFF (12), et qui se prépare de la manière suivante :

8 gr de sous-nitrate de bismuth sont dissous dans 25 cm³ d'acide nitrique à 30 p. 100. La solution est additionnée doucement du mélange suivant :

- iodure de potassium	28 g
- acide chlorhydrique 6 N	1 cm ³
- eau	5 cm ³

Il se forme un précipité sombre qui se liquéfie après refroidissement en glacière. La solution filtrée et amenée à 100 cm³ constitue la solution mère.

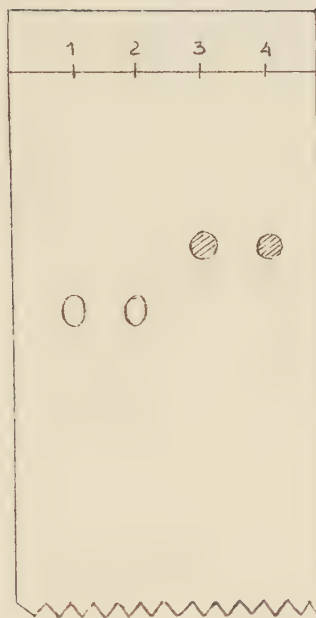
Pour la révélation, il faut diluer le réactif, en ajoutant dans l'ordre :

- eau	20 cm ³
- acide chlorhydrique 6 N	5 cm ³
- solution mère	2 cm ³
- soude 6 N	5 cm ³

Après passage dans ce bain, les spots de choline apparaissent immédiatement en jaune orangé sur fond jaune pâle, tandis que ceux des autres substances : glycérilphosphorylcholine, bétaine, ne se colorent qu'après un temps de séchage plus ou moins prolongé, dans une nuance différente.

Résultats obtenus -a) En système solvant alcalin, phase descendante.

Nous chromatographions, comparativement, la solution témoin de glycérilphosphorylcholine et l'extrait purifié de choline hydrosoluble combinée, dont le rapport N|CHC est voisin de 2. Nous vérifions que le spot de la choline se différencie de celui de ces deux substances mais qu'il est à la même place que celui de la base libérée par hydrolyse acide de la choline hydrosoluble combinée.



en 1 : choline témoin

en 2 : choline hydrosoluble combinée hydrolysée

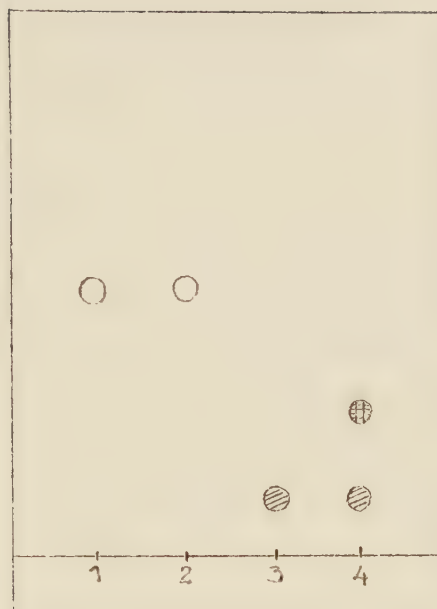
en 3 : glycérylphosphorylcholine témoin

en 4 : choline hydrosoluble combinée de la Patelle

b) En système solvant acide, phase ascendante.

Nous observons la présence d'un troisième spot ayant un R_F distinct de celui de la choline et de la glycérylphosphorylcholine ; c'est celui d'une substance que contient l'extrait de Patelles et que nous identifions à la bétaine au cours de notre travail. Cette bétaine accompagne la choline hydrosoluble combinée dans l'extrait purifié, mais elle ne gêne pas puisque son spot est nettement différent de celui de la glycérylphosphorylcholine.

Cette phase acide a donc l'avantage de séparer bétaine et glycérylphosphorylcholine, ce que ne permet pas la phase alcaline.



en 1 : choline témoin

en 2 : reineckate de choline de la Patelle

en 3 : glycérylphosphorylcholine témoin

en 4 : choline hydrosoluble combinée de la Patelle.

En résumé -

Les spots de la choline hydrosoluble combinée et de la glycérylphosphorylcholine ont le même R_F dans deux systèmes différents ; il en est de même pour ceux de la choline témoin et de la base libérée par hydrolyse acide.

Nous concluons à leur identité de constitution.

2°. Electrophorèse sur papier.

WIELAND et FISHER (88) ont les premiers proposé l'emploi du papier pour la microélectrophorèse et son emploi pour la séparation de très petites quantités de quelques aminoacides. Depuis, cette technique a été utilisée pour d'autres matériels, et notamment les ammoniums quaternaires par MUNIER (69).

De même qu'en chromatographie sur papier on peut faire varier les phases solvantes, en électrophorèse on peut également faire varier les tampons car les ammoniums quaternaires se déplacent dans le champ électrique avec des vitesses de migration différentes suivant leur charge, cette charge variant avec le pH du milieu.

Techniques d'électrophorèse.

Nous utilisons un appareil analogue à celui décrit par MACHEBOEUF et REBEYROTTE (61) et monté au laboratoire par SIMENAUER.

L'appareil se compose de deux cuvettes en verre ayant 24 cm de longueur, 11,5 cm de largeur et 6 cm de hauteur, disposées parallèlement sur un support ; l'intervalle qui les sépare est occupé par un chevalet en verre destiné à soutenir l'électrophorégramme. Dans chaque cuve plonge une petite électrode en fil de platine reliée à un pôle électrique d'un générateur de courant continu. L'ensemble est recouvert par un toit condenseur dièdre destiné à éviter l'évaporation du tampon.

Nous utilisons le papier Durieux, n° 98, découpé en bandes de 46 cm de longueur sur 18 cm de largeur. Nous déposons le produit à analyser à l'aide d'une micropipette, sur une longueur de 2 cm, suivant une ligne qui partage la feuille en deux parties égales, dans le sens de la largeur.

Nous plaçons ensuite la feuille sur le chevalet de manière à ce que la ligne médiane du papier repose sur l'arête du chevalet en verre ; nous plongeons chaque extrémité de la feuille dans une cuve contenant 500 cm³ du tampon et nous l'imbibons de ce tampon à l'aide d'une pipette. Nous couvrons ensuite du petit toit et nous faisons passer le courant électrique. Nous opérons en général avec un champ de 400 volts, sous une intensité de 10 à 15 μ A.

Tampons utilisés -

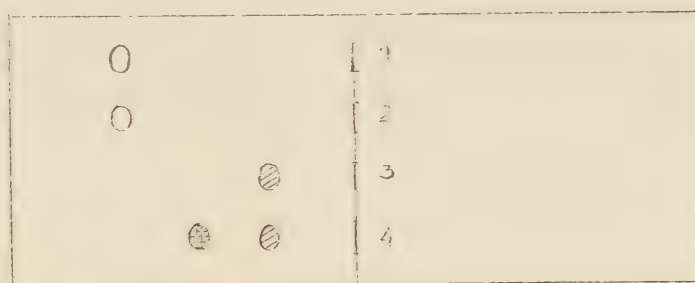
Pour les substances à fonction ammonium quaternaire MUNIER préconise l'emploi d'un tampon au véronal pH 8,6 (69). Nous avons obtenu de meilleurs résultats : bonne migration et séparation satisfaisante des produits, spots très nets, en utilisant un tampon acide à pH 2,4, ainsi préparé : acide oxalique : 6,5 g dissous dans 1 litre d'eau et additionné de 2,5 cm³ de soude 10 N. Cette solution doit être diluée dix fois avant l'emploi.

Révélation des spots -

Nous soumettons les substances à l'électrophorèse pendant 1 h. 30 ou 2 heures, puis nous séchons la feuille de papier pendant une dizaine de minutes dans l'étuve à 100°. Nous la plongeons ensuite dans la solution de Dragendorff, de formule ci-dessus.

Résultats obtenus -

Après 1 h. 30 d'électrophorèse à pH 2,4 de la solution purifiée de choline hydrosoluble combinée de la Patelle, nous obtenons deux spots, l'un situé au même endroit que celui de la glycérylphosphorylcholine témoin, l'autre correspond à la bétaine que nous identifions ultérieurement.



en 1 : choline témoin

en 2 : choline de la choline hydrosoluble combinée

en 3 : glycérylphosphorylcholine témoin

en 4 : extrait de Patelles.

La choline hydrosoluble combinée et la glycérylphosphorylcholine ont un comportement identique vis-à-vis de l'électrophorèse sur papier.

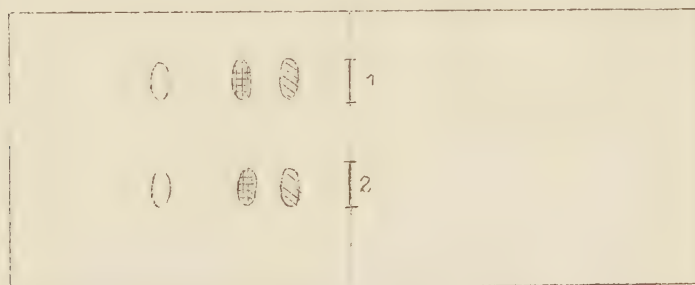
L'Electrophorèse de l'extrait non purifié.

L'électrophorèse sur papier de l'extrait aqueux de Patelles, non purifié, ne donne aucun résultat utilisable. Ainsi que nous l'avons mis en évidence, ce sont des substances aminées qui y accompagnent la choline hydrosoluble combinée ; ces substances paraissent s'opposer à toute migration lors du

passage du courant. Dissimulés, les groupements NH_2 libres, ne doivent théoriquement plus perturber le déplacement des autres ions. Pour les masquer nous utilisons l'aldéhyde formique et nous soumettons à l'électrophorèse la solution obtenue.

Mode opératoire -

Nous traitons 1 cm^3 d'un extrait de Patelles dilué à 10 cm^3 par un égal volume de la solution commerciale d'aldéhyde formique. Nous neutralisons ensuite par la soude $\text{N}/10$ et nous évaporons la solution au bain-marie. Il reste un résidu important dont nous éliminons une partie par deux reprises successives par le méthanol. Le dernier résidu est dissous dans de l'eau et nous y donnons la choline libre et la choline hydrosoluble combinée : la moitié de la choline libre a disparu et il ne reste que 75% de la choline combinée. Par électrophorèse du liquide, dans les conditions déjà décrites, nous obtenons 3 spots que nous pouvons identifier à la choline, la glycérilphosphorylcholine et la bétaine, les trois substances triméthylammonnées présentes dans la Patelle.



en 1 : mélange témoin : choline
bétaine
glycérilphosphorylcholine

en 2 : extrait de Patelles.

En résumé --

Nous identifions après purification, la choline hydrosoluble combinée de la Patelle, à la glycérylphosphorylcholine, par chromatographie et par électrophorèse.

DEUXIEME CHAPITRE

LA BETAINE DANS LA PATELLE

C'est dans les tissus végétaux que la bétaine est découverte pour la première fois, en 1862 (41). Elle est abondante surtout dans la betterave (77), mais dès 1886, BRIEGER (13) la signale comme constituant des Moules et quelques années plus tard, elle est caractérisée avec soin dans les extraits de Crabes (1) et de Céphalopodes (38). Depuis, de nombreux auteurs mettent en évidence la bétaine dans des matériels animaux variés, mais surtout chez les animaux inférieurs : Invertébrés et Poissons, où elle existe en très petites quantités, et ne représente qu'un faible pourcentage du poids des tissus (47) (36).

Ces dernières années, MII (64) l'isole du muscle de Homard sous forme de flavianate, mais elle ne représente que 2,9 mg par g. des tissus frais ; elle n'est pas plus abondante dans le muscle d'Epinoches (63), dans le coeur de Vénus (87) dans le foie des Moules (74) ni dans le muscle de divers poissons (78).

La bétaine que nous identifions dans la Patelle, animal chez lequel cette substance n'a jamais été trouvée, atteint un taux très élevé de 5 à 6 mg par g. d'animal, soit près de 2°|o de tissus secs, jamais signalé jusqu'ici dans les organes animaux et voisin des teneurs les plus élevées des organes végétaux, puisque la betterave, source la plus importante de bétaine n'en contient que 3°|o du poids sec (36), ou d'après CROMWELL (19) 4,85°|o dans les feuilles à un certain stade de croissance de la plante.

Dans ce chapitre, nous étudions successivement :

- l'isolement d'un reineckate dit "acide" et l'étude de ses propriétés.
- l'étude du phosphotungstate de la base.
- l'identification de la base, sous forme d'iodure.
- l'étude comparée de la base et de la bétaine.
- le taux de la bétaine dans la Patelle, et sa répartition dans les différents organes.

I. LE "REINECKATE ACIDE" de la PATELLE.

1°. Mise en évidence.

Au cours de notre travail sur l'identification de la choline hydrosoluble combinée de la Patelle et opérant sur l'extrait aqueux déféqué de Patelles, nous observons que les liqueurs mères de précipitation du reineckate de choline donnent par acidification un nouveau précipité de reineckate, abondant, rose violacé, chatoyant, que nous vérifions être exempt de choline libre et de choline hydrosoluble combinée.

En outre, par chromatographie et par électrophorèse de la solution purifiée de choline hydrosoluble combinée, nous révélons par le réactif de DRAGEN-DORFF, un spot qui n'est identifiable ni à la choline, ni à la glycérylphosphorylcholine.

Nous nous sommes proposés d'identifier la substance qui donne le précipité de reineckate en milieu acide, et de vérifier si elle n'est pas responsable de ce spot observé en chromatographie et en électrophorèse.

2°. Préparation du "reineckate acide".

A 250 cm³ d'un extrait aqueux provenant de la défécation ferrique de 200 g. de Patelles, nous ajoutons un volume égal de solution saturée à froid de sel de Reinecke, fraîchement préparée. Après avoir abandonné une heure en glacière, nous éliminons par filtration le reineckate impur de choline qui a précipité ; nous additionnons les liqueurs mères de 3 - 4 cm³ d'acide chlorhydrique fumant (densité : 1,19) ; après séjour en glacière d'une heure, nous vérifions que la quantité de sel de Reinecke est suffisante. Si une nouvelle addition de réactif ne donne pas précipité, ce qui est généralement le cas, nous essorons le reineckate sur verre fritté G₃, nous le lavons par une vingtaine de cm³ d'eau glacée, légèrement acidulée ; nous le séchons sous pression réduite dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique, puis jusqu'à poids constant, à l'étuve à 60°. Cette opération fournit 5 g. de "Reineckate acide" brut.

3°. Purification du "Reineckate acide".

Après calcination, le reineckate laisse un résidu d'oxyde chromique vert Cr₂O₃ de poids variable avec le poids moléculaire de la base dont le

reineckate est ainsi incinéré ; ce sont les variations du rapport Cr_2O_3 | reineckate que nous utilisons pour vérifier l'efficacité des procédés de purification. (82,9 mg de reineckate brut laissent un résidu de 15,6 mg , soit 18,9 % du composé initial).

a) recristallisation dans l'eau chaude.

500 mg de "reineckate acide" sont dissous dans 50 cm³ d'eau bouillante ; nous filtrons pour éliminer une petite fraction insoluble et nous laissons refroidir lentement la solution à la température du laboratoire, puis en glacière. Il se forme de beaux cristaux que nous essorons et séchons jusqu'à poids constant. Nous ne récupérons que 40% du matériel brut. Après deux traitements identiques, nous obtenons 30% du reineckate initial (incinération : 93,7 mg laissent un résidu de 16,9 mg) : le taux de Cr_2O_3 est donc passé de 18,9% à 18%.

Cette valeur ne varie pas après un traitement supplémentaire.

b) dissolution en milieu alcalin.

345 mg de "reineckate acide" sont dissous à froid dans 50 cm³ d'une solution de bicarbonate de sodium à 4 p. 100. Nous agitons jusqu'à dissolution et nous éliminons par filtration rapide quelques mg insolubles. Nous acidifions ensuite immédiatement le filtrat par 2 cm³ d'acide chlorhydrique concentré ; après un séjour de une heure en glacière, nous recueillons le précipité formé par essorage, lavage et dessiccation jusqu'à poids constant.

Le rendement est de 66% du reineckate primitif ; (44,9 mg calcinés laissent 8,0 mg de résidu, c'est-à-dire 17,8% Cr_2O_3).

Après deux purifications successives analogues à celle-ci nous obtenons 155 mg de reineckate, dont 72,5 mg laissent par incinération un résidu de 12,9 mg, soit 17,7% Cr_2O_3 , teneur identique à la précédente.

La purification du "reineckate acide" se fait donc avec un rendement médiocre, par recristallisation soit dans l'eau bouillante, soit dans l'eau alcaline ; elle permet d'obtenir un reineckate purifié qui après calcination, laisse un résidu voisin de 18%, alors que le reineckate initial en laissait un de 19%.

4°. Propriétés du reineckate purifié.

a) recherche du phosphore.

Le phosphore est recherché sur le produit d'attaque nitro-perchlorique de 45 mg de reineckate purifié. La présence du chrome troublant la réaction au phosphomolybdate, l'acide phosphorique est recherché à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien. Résultat négatif.

b) c'est le reineckate d'une substance triméthylammoniée.

COTTE et KAHANE (18) puis KAHANE et SIMENAUER (51) ont mis au point une technique d'oxydation des substances triméthylammonnées en milieu alcalin par le permanganate, et par le manganate et le persulfate de potassium, suivie d'entraînement des bases distillables en présence de formol.

Nous utilisons ce procédé afin de rechercher si la substance isolée sous forme de "reineckate acide" est triméthylammonnée.

99,8 mg de "reineckate acide" sont soumis à l'action du manganate de potassium, à l'ébullition, en milieu alcalin ; après entraînement des bases distillables en présence de formol, nous ne dosons par l'acide sulfurique N | 10 que 23% de triméthylamine ; mais après oxydation persulfurique et l'entraînement des bases distillables, nous utilisons 1,19 cm³ l'acide sulfurique N | 50, soit 357% de triméthylamine.

Le "reineckate acide" contient donc une substance triméthylammonnée qui résiste à l'oxydation manganique mais qui libère de la triméthylamine par oxydation persulfurique.

Nous ne pouvons utiliser le chiffre obtenu pour en déduire la composition de la base, parce que comme les auteurs le signalent, dans ces conditions le rendement de l'opération est loin d'être quantitatif.

c) oxydation permanganique en milieu acide.

L'oxydation permanganique en milieu acide peut fournir des indications sur la nature du groupement fonctionnel d'une substance ; les corps à fonctions réductrices : alcool, aldéhyde, s'oxydent en acide correspondant en consommant de l'oxygène. LINTZEL et FORMIN (59) utilisent cette propriété lorsqu'ils font l'étude systématique de l'oxydation permanganique acide de la choline et de quelques composés voisins ; ainsi ils observent que la molécule de choline s'oxyde en bétaine, en consommant une molécule d'oxygène. E. KAHANE (46) au cours de son travail sur les méthylcholines précise les conditions d'oxydation. Nous

opérons suivant la technique qu'il a définie pour mettre en évidence une consommation éventuelle d'oxygène ; nous ne pouvons faire directement l'expérience sur le reineckate dont l'anion est oxydable et nous devons tout d'abord le transformer en chlorure.

Mode opératoire.

Le "reineckate acide" est transformé en chlorure à l'aide de solutions de sulfate d'argent et de chlorure de baryum moléculairement équivalentes.

5 g. de reineckate sont dissous dans 50 cm³ d'eau bouillante et additionnés de 450 cm³ d'une solution de sulfate d'argent à 0,4 p. 100 ; nous filtrons le précipité de reineckate d'argent et nous ajoutons au filtrat 450 cm³ de chlorure de baryum à 0,26 p. 100. Après élimination du sulfate de baryum et du chlorure d'argent, nous concentrons le liquide obtenu jusqu'à un volume de 100 cm³ ceci constitue la solution stock du chlorure de la substance, que nous utilisons pour l'étude de celle-ci.

Nous diluons à 20 cm³ 5 cm³ de la solution de chlorure correspondant à 250 mg de "reineckate acide" et nous ajoutons :

- permanganate de potassium, 0,1 N : 25 cm³
- acide sulfurique, à 10 p. 100 5 cm³

et nous abandonnons à la température de la pièce pendant 24 heures. Nous versons alors 25 cm³ d'acide oxalique 0,1 N et nous titrons l'excès par du permanganate de potassium 0,1 N. Nous en versons 0,10 cm³. Il n'y a donc pas eu utilisation du permanganate initial : la substance ne consomme pas d'oxygène.

Conclusion -

La substance isolée de l'extract aqueux déféqué de Patelles est donc une substance triméthylammoniée, dépourvue de phosphore, non oxydable.

II. PHOSPHOTUNGSTATE DE LA BASE.

Le reineckate est une forme commode d'isolement et de conservation de la base, mais il n'est guère accessible à l'analyse directe ; nous tentons de préparer, à partir de ce reineckate, un composé mieux défini dont les propriétés et la composition puissent nous conduire à une identification.

E. et M. KAHANE (43) signalent que de nombreuses bases organiques sont

susceptibles de précipiter sous forme de phosphotungstates anhydres, qui dans la plupart des cas sont des composés bien définis quelles que soient les conditions de précipitation, et qui par calcination laissent un résidu d'anhydride phosphotungstique ; le rapport, poids de l'anhydride | poids du phosphotungstate est constant et caractéristique d'une base donnée.

Nous utilisons cette propriété, après avoir vérifié que la base du "reineckate acide" peut précipiter à l'état de phosphotungstate ; nous en préparons une certaine quantité en vue de son étude.

Mode opératoire.

Une prise d'essai de 1 cm³ de la solution de chlorure préparée ci-dessus correspondant à 50 mg de "reineckate acide" est diluée à 5 cm³ et acidifiée par 2 ou 3 gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Elle est portée à l'ébullition et additionnée peu à peu de 5 cm³ d'acide phosphotungstique à 10 p. 100. L'ébullition étant maintenue, il se produit un précipité qui ne s'accroît pas par addition ultérieure du réactif.

Après refroidissement à la température de la pièce, puis en glacière, nous recueillons par centrifugation un phosphotungstate blanc que nous lavons par 2 cm³ d'eau distillée à 0° et que nous séchons à l'étuve jusqu'à poids constant. Nous obtenons 110 mg de phosphotungstate.

Résultats.

Nous calcinons au rouge sombre 61,1 mg de ce phosphotungstate et nous recueillons 53,9 mg d'anhydride ; le rapport poids d'anhydride | poids de phosphotungstate est donc de 88,2°|o.

Mais ce rapport n'est pas constant, il varie avec les conditions de précipitation. Ainsi, si nous opérons de manière identique, mais à froid, nous recueillons le même poids d'un phosphotungstate dont 85,2 mg calcinés laissent 74,6 mg de résidu ; dans ce cas, le rapport n'est que de 87,5°|o.

Conclusion.

Le phosphotungstate de la substance étudiée est donc mal défini, sa composition varie avec les conditions de précipitation et nous ne pouvons utiliser ce matériel pour identifier la base. Nous préparons un autre sel.

III. IODURE DE LA BASE.

Nous observons sous microscope, qu'une goutte de solution de chlorure, acidifiée et additionnée d'une goutte de réactif iodo-ioduré, donne après un séjour en glacière de quelques minutes, des cristaux de periodure brun foncé, en forme d'aiguilles souvent groupées en oursins. Nous utilisons cette propriété pour préparer un periodure, que nous transformons en iodure, susceptible d'être soumis à l'analyse.

1°. Précipitation du periodure.

Après différentes tentatives, nous définissons ainsi les conditions de préparation du periodure.

A 20 cm³ de la solution de chlorure ci-dessus, nous ajoutons 1 cm³ d'acide chlorhydrique concentré et 20 cm³ de réactif iodo-ioduré. Au cours de nos premiers essais nous opérions avec le réactif utilisé pour le dosage de la choline (24 g iodure de potassium, 16 g iode et de l'eau pour amener à 100 cm³), mais l'iodure obtenu ultérieurement était souillé d'impuretés minérales ; nous préférons donc utiliser un réactif renfermant les mêmes quantités de produits, mais dans lequel l'iodure de sodium plus soluble, donc plus facile à éliminer par lavage, remplace l'iodure de potassium.

Après l'addition de ce réactif, il se forme un précipité huileux qui se transforme en beaux cristaux verdâtres, à reflets métalliques, après un séjour de 3 heures à la glacière. Pour recueillir et laver ce précipité nous ne pouvons opérer comme pour le periodure de choline : centrifugation et lavage sans remise en suspension du précipité ; ce periodure a une constitution cristalline différente et les cristaux retiennent entre eux des liqueurs mères de précipitation chargées de sels, qui, comme nous l'avons observé dans nos premières expériences, accompagnent l'iodure et s'éliminent très difficilement. Le précipité peu soluble dans l'eau est recueilli par filtration sur un creuset en verre frité G₃ et lavé 2 ou 3 fois par 4 ou 5 cm³ d'eau glacée acidifiée par quelques gouttes d'acide chlorhydrique.

2°. Préparation de l'iodure et purification.

L'iode libre du periodure est chassé par chauffage de la solution

hydroalcoolique et l'iodure est purifié par addition d'éther à sa solution alcoolique.

Mode opératoire.

Le periodure lavé est dissous dans 40 cm³ d'un mélange d'alcool éthylique et d'eau (1|1) ; l'iode libre est chassé au bain-marie bouillant. Nous dissolvons le résidu dans 10 cm³ du même mélange et nous amenons à siccité ; l'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à disparition complète des vapeurs violettes. Après dessiccation du dernier résidu, nous obtenons 330 mg d'iodure jaune, impur.

A la calcination, 27,10 mg de cet iodure dégagent une nette odeur de triméthylamine et laissent 0,90 mg de cendres, c'est-à-dire 3,3°|o. Ce produit ne peut donc être soumis directement à l'analyse et doit être purifié.

a) recristallisations successives dans l'alcool.

100 mg d'iodure sont dissous dans 5 cm³ d'alcool bouillant. Par refroidissement lent et après séjour en glacière il se forme des petits cristaux blanchâtres, mais ceux-ci ne représentent que 37°|o de l'iodure brut. De plus, la purification est insuffisante, car la calcination de 26,3 mg laisse encore 1,2°|o de cendres.

b) précipitation par l'éther de l'iodure en solution alcoolique.

Une solution alcoolique de l'iodure précipite par addition d'éther. Nous dissolvons dans 20 cm³ d'alcool éthylique bouillant 330 mg d'iodure brut, nous ajoutons quelques gouttes d'éther ; après refroidissement lent, nous ajoutons l'éther par petites portions jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de précipitation ; nous utilisons environ 3 volumes d'éther. Après séjour à la glacière, nous centrifugeons et nous séchons sous pression réduite dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique. Nous récupérons ainsi 65°|o de l'iodure primitif ; 89 mg par calcination ne laissent que 0,96 mg de cendres, soit 1,1°|o. Après un deuxième traitement identique, nous obtenons 45°|o de l'iodure brut ne contenant que 0,6°|o de substances non combustibles. L'échantillon suffisamment purifié peut être analysé.

3°. Etude de l'iodure.

a) propriétés physiques.

Petits cristaux blanc jaunâtre, très solubles dans l'eau, non hygroscopiques, peu solubles dans l'alcool éthylique à froid, très solubles à chaud, insolubles dans l'éther.

b) point de fusion.

A l'aide du microscope, nous observons la fusion de quelques cristaux d'iodure, placés sur la plaque chauffante de l'appareil de KOFER (53). La fusion commence à 228° et finit à 231°.

c) composition centésimale.

Techniques utilisées :

L'iode est dosé par la méthode Charpentier-Volhard et l'azote par la méthode de Kjeldahl après minéralisation de la substance par l'acide sulfurique en présence de catalyseurs (sulfate de potassium + sulfate de cuivre) ; la durée de l'attaque doit être au moins de 3 heures, sinon la minéralisation n'est pas complète et les valeurs obtenues sont en défaut.

Le carbone et l'hydrogène ont été dosés par microcombustion au Laboratoire Municipal et au Laboratoire de microanalyse de la Faculté de Médecine, que nous remercions pour leur complaisance.

L'oxygène est dosé par microconversion en oxyde de carbone au Laboratoire de microanalyse de Saint Gobain que nous remercions également.

Résultats :

La composition centésimale de l'iodure se traduit par les chiffres suivants :

- cendres	0,66 ‰
- iode	33,80
- azote	7,48
- carbone	33,58
- hydrogène	6,35
- oxygène	<u>18,66</u>
	100,47

En choisissant l'atome d'azote comme unité, nous pouvons calculer une formule brute du corps analysé.

N :	7,48	%	x	$\frac{1,87}{14}$	:	1	atome
I :	33,80		x	$\frac{1,87}{127}$	:	0,48	"
C :	33,58		x	$\frac{1,87}{12}$	:	5,25	"
H :	6,35		x	$\frac{1,87}{1}$	:	11,90	"
O :	18,60		x	$\frac{1,87}{16}$	:	2,10	"

ce qui donne $(I_{0,48} C_{5,2} H_{11,9} O_{2,1} N)_n$.

Cet iodure est donc celui d'une substance ayant la composition centésimale de la bétaine dont le cation $^+N(CH_3)_3CH_2CO_2H$ s'exprime par la formule brute $C_5H_{12}O_2N$; il possède un rapport nombre d'atomes d'azote | nombre d'atomes d'iode voisin de 2, c'est-à-dire qu'il n'y a qu'un seul atome d'iode pour deux molécules de base.

Nous allons vérifier qu'il s'agit réellement de la bétaine et que cet hémiodure a la composition centésimale du sel analogue de la bétaine.

IV. L'IODURE DE BETAINE.

1°. Periodure de bétaine.

STANECK (81) signale que les sels de bétaine en solution aqueuse, donnent avec le triiodure de potassium, un précipité verdâtre à reflets métalliques, filtrable après un séjour à basse température ; il observe que sa solubilité dans l'eau est diminuée par le chlorure de sodium ou l'acide sulfurique. L'aspect physique et les propriétés du periodure de bétaine sont tout à fait semblables à ceux du periodure de la substance triméthylammoniée de la Patelle.

Mode opératoire.

A 25 cm³ d'une solution aqueuse à 1 p. 100 de chlorhydrate de bétaine synthétique, nous ajoutons 1,5 cm³ d'acide chlorhydrique et 25 cm³ de réactif iodo-ioduré à l'iodure de sodium.

Après un séjour de 3 heures en glacière, nous essorons le periodure, ayant l'aspect décrit par STANECK, sur verre fritté et nous le lavons par de l'eau acidulée glacée.

2° Iodure de bétaine.

Dès 1876, BRUHL (14) prépare différents sels de bétaine et observe notamment qu'à côté de l'iodure normal, il existe un "iodhydrate basique" n'ayant qu'un atome d'iode pour deux molécules de base qui cristallise en beaux cristaux blancs, mais difficile à obtenir pur. WILLSTATTER (90) étudie l'iodure classique et définit son point de fusion à 188-190, mais c'est STOLTZENBERG (82) qui fait le travail le plus approfondi. Il prépare à partir d'une solution aqueuse de bétaine et d'acide iodhydrique, un iodure normal qui fond à 200° et en traitant cet iodhydrate en solution par une solution de bétaine, il obtient des cristaux blancs d'un hémiodure pour lesquels il observe la fusion avec décomposition à 242° et de formule brute $I C_{10} H_{24} O_4 N_2$. Les travaux de BRUHL et de STOLTZENBERG nous avaient échappé et nous ignorions l'existence de cet hémiodure, que nous avons retrouvé au cours de notre travail.

Nous vérifions qu'en opérant dans des conditions identiques à celles décrites pour la préparation de l'iodure de la base de la Patelle, nous obtenons l'hémiodure de bétaine.

Après avoir chassé l'iode libre de la solution hydroalcoolique du périodure, nous obtenons un iodure que nous purifions par dissolution dans l'alcool éthylique et précipitation par l'éther. Après deux traitements successifs, il reste 170 mg d'iodure de bétaine pratiquement pur puisque 12,9 mg calcinés ne laissent que 0,07 mg de cendres, soit 0,6°|o ; le rendement est de 40°|o.

a) propriétés et point de fusion.

Nous obtenons un sel blanc jaunâtre, très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool à froid, très soluble à chaud et insoluble dans l'éther. Son point de fusion déterminé sous microscope avec l'appareil de KOFLER est compris entre 229° et 231°. Cette valeur est différente de celle donnée par STOLTZENBERG qui donne pour l'iodure proprement dit un point de fusion de 10° plus élevé que WILLSTATTER. Ce point de fusion est identique à celui trouvé avec l'hémiodure de la base de la Patelle.

Les dosages d'iode et d'azote montrent qu'il s'agit d'un iodure renfermant 7,37°|o d'azote et 32,8°|o d'iode, c'est-à-dire que le rapport nombre d'atomes d'azote | nombre d'atomes d'iode est de 2,04 - Il s'agit donc bien de "l'iodhydrate basique", c'est-à-dire de l'hémiodure.

b) comparaison avec l'iodure de la base de la Patelle.

Le mélange des deux iodures, naturel et synthétique, fondant séparément à $228^{\circ} - 231^{\circ}$ et $229^{\circ} - 231^{\circ}$, fond à $228^{\circ} - 231^{\circ}$, ce qui établit leur identité. L'analyse du produit naturel comparée aux valeurs calculées, est donnée dans le tableau I et montre qu'il y a un accord satisfaisant.

I.-COMPOSITION CENTESIMALE DE L'IODURE
DE LA BASE DE LA PATELLE ET DE L'IODURE DE LA BETAINE SYNTHETIQUE.

Eléments	Base de la Patelle	Calculé pour l'hémiiodure de bétaine
I	33,80 %	33,72 %
H	7,48	7,44
C	33,58	35,10
N	6,55	6,66
O	18,66	17,00

Conclusion.

Nous isolons de l'extrait aqueux de Patelles une substance qui a la composition centésimale de la bétaine ; sa forme d'isolement est un hémiiodure qui a les propriétés de l'hémiiodure préparé à partir d'une solution de chlorhydrate de bétaine synthétique.

Dès à présent, nous pensons que la substance triméthylammoniée isolée de la Patelle et la bétaine ne sont qu'un seul et même corps, mais nous voulons apporter d'autres preuves de cette identité.

V. LE PHOSPHOTUNGSTATE DE BETAINE.

E. et M. KAHANE (43) définissent les conditions de précipitations des phosphotungstates de nombreuses bases azotées et notamment de la bétaine. Ils remarquent que pour celle-ci il n'y a pas le même accord que pour les autres bases étudiées entre la valeur théorique du rapport : poids de l'anhydride phosphotungs-

tique | poids du sel séché à 100°, qui est de 88,58 et la valeur trouvée par l'expérience : 88,11. Ils incriminent la présence, dans les échantillons commerciaux de chlorhydrate de bétaine sur lesquels ils travaillent, d'une impureté impossible à éliminer par cristallisation fractionnée. Nous montrons dans ce travail que le phosphotungstate de bétaine est un sel mal défini, dont la composition varie suivant les conditions de préparation, et que c'est là la cause de l'anomalie relevée par E. et M. KAHANE.

1°. Mise en évidence des variations de composition.

a) précipitation à chaud.

Nous portons à l'ébullition 5 cm³ d'une solution de chlorhydrate de bétaine à 1 p. 100, en présence de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et nous ajoutons 5 cm³ d'une solution d'acide phosphotungstique à 10 p. 100. Il se produit un précipité qui s'accroît au cours du refroidissement. Après séjour à la glacière, nous recueillons 290 mg de sel.

Par incinération, 41,5 mg laissent un résidu de 38,7 mg ; dans ce cas, le rapport, poids d'anhydride | poids du sel, est de 88,4°|o.

b) précipitation à froid.

En précipitant le phosphotungstate à froid, nous obtenons un même poids de sel, mais le rapport n'est que de 87,8°|o, puisque 38,5 mg calcinés laissent 33,8 mg d'anhydride.

Ayant vérifié que les deux phosphotungstates examinés sont bien secs, car ils ne perdent rien à l'étuve, nous en déduisons qu'ils sont légèrement différents.

2°. Etude de ces variations.

Pour expliquer ces différences, trois hypothèses sont possibles.

- la présence dans la solution de chlorhydrate de bétaine synthétique d'une impureté qui se concentre dans la fraction du phosphotungstate cristallisant au cours du refroidissement.

- une hydratation de ce même phosphotungstate.

- un phosphotungstate de bétaine mal défini.

Nous nous proposons de mettre en évidence la cause de ces variations en analysant les divers types de phosphotungstate de bétaine obtenus ci-dessus.

Mode opératoire.

Nous précipitons le phosphotungstate à l'ébullition selon la technique déjà décrite, à partir de 5 cm³ d'une solution de chlorhydrate de bétaine à 10 p. 100. Nous séparons, par filtration à chaud, le précipité formé à l'ébullition, puis nous recueillons par centrifugation le sel qui se dépose par refroidissement du filtrat.

- soit A, le précipité formé à chaud pesant 1 220 mg.

- soit B, le précipité formé par refroidissement pesant 790 mg.

Nous préparons également le phosphotungstate brut sans séparation à chaud et à froid, et qui correspond par conséquent au mélange de A et de B - C'est le précipité C.

Ces trois précipités sont soumis à l'analyse : dosage de l'anhydride phosphotungstique, du carbone, de l'azote et de l'hydrogène, suivant les techniques déjà utilisées.

Résultats. (tableau II)

II.- COMPOSITION CENTESIMALE DU PHOSPHOTUNGSTATE DE BETAINÉ -

Echantillon	$12 \text{ WO}_3 \text{ PO}_3 \text{ H}$	N %	C %	H %	$\frac{\text{C}}{\text{N}}$	$\frac{\text{N}}{12 \text{ WO}_3 \text{ PO}_3 \text{ H}}$
A	38,5	1,27	5,64	1,20	5,1	2,96
B	37,6	1,49	6,29	1,44	4,9	3,47
C	38,2	1,55	5,70	1,10	5	3,10
Calculé	38,6	1,29	5,56	1,11	5	3

Conclusion.

Ces chiffres montrent :

1°) que les précipités A, B et C sont bien des phosphotungstates de bétaine dans lequel le rapport C|N défini comme étant celui du nombre d'atomes

de carbone au nombre d'atomes d'azote est très voisin de 5, et qu'ils ne sont pas hydratés (rapport H|N normal).

2°) que les phosphotungstates B et C sont différents du phosphotungstate de bétaine théorique.

3°) qu'il semble que le phosphotungstate formé à chaud ait une composition voisine de la composition théorique ; alors que celui qui se forme par refroidissement s'enrichit en base.

Il ne s'agit donc dans aucun cas d'un phosphotungstate de bétaine souillé ou hydraté, mais sa composition est différente suivant qu'il a été isolé à chaud ou par cristallisation au cours du refroidissement.

Nous nous proposons de montrer maintenant qu'une simple modification dans le mode d'obtention peut donner lieu à la transformation d'un phosphotungstate en un autre.

Mode opératoire.

Nous traitons 700 mg du précipité A, par 100 cm³ d'eau bouillante ; une partie du phosphotungstate passe en solution ; après filtration rapide à chaud le filtrat fournit par refroidissement un précipité A', de 450 mg. Nous avons ainsi préparé un phosphotungstate de type B, aux dépens du phosphotungstate A. Par calcination 26,27 mg laissent un résidu de 23,02 mg donc de 87,6°|o.

Conclusion.

Le phosphotungstate A, que nous considérons comme étant le plus proche du phosphotungstate théorique peut, par simple modification des conditions de formation donner naissance à un sel A' plus riche en base. Le phosphotungstate de bétaine est donc mal défini.

Contrairement à ce que pensaient E. et M. KAHANE (43) si le rapport, anhydride phosphotungstique | phosphotungstate, calculé après calcination du phosphotungstate de bétaine est différent du rapport théorique, ce n'est pas à cause d'une impureté difficile à éliminer, mais parce que le sel recueilli dans les conditions où ils opèrent est un mélange des deux formes, celle formée à l'ébullition et celle qui cristallise par refroidissement.

La formule $12 \text{ WO}_3\text{PO}_4 \left[\text{N} (\text{CH}_3)_3 - \text{CH}_2 - \text{CO}_2\text{H} \right]_3$ donnée pour le phosphotungstate de bétaine ne correspond par conséquent qu'au sel formé à l'ébullition.

Le phosphotungstate de bétaine, sel mal défini dont la composition varie avec les conditions de précipitation, ne diffère pas à cet égard du phosphotungstate de la base isolée de la Patelle.

Ce n'est pas le seul sel de bétaine anormal, puisque BECKER (3) signale que le chloroaurate est un composé dans lequel il y a plus d'une molécule de bétaine pour une molécule de chlorure d'or et que pour éviter la formation de ses sels basiques, il faut faire la recristallisation en présence de chlorure d'or et d'acide chlorhydrique.

VI. LE REINECKATE DE BETAINE.

Nous isolons la substance triméthylammoniée de l'extrait aqueux de Patelles, sous forme de "reineckate acide", qui après plusieurs purifications successives laisse un résidu d'oxyde chromique voisin de 18%₁₀. Nous vérifions qu'une solution de chlorhydrate de bétaine synthétique précipite un "reineckate acide" analogue à celui isolé de la Patelle et que calciné, il laisse un résidu identique.

Mode opératoire.

100 mg de chlorhydrate de bétaine sont dissous dans 20 cm³ d'eau et additionnés d'un volume égal de solution saturée de sel de Reinecke. Il n'y a pas de précipité. Par addition de 0,5 cm³ d'acide chlorhydrique, il se forme instantanément un précipité rose, satiné, semblable au "reineckate acide" de la Patelle. Nous laissons une heure en glacière, nous essorons, nous lavons par de l'eau acidulée glacée et nous séchons sous vide dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique, puis à l'étuve à 60°, jusqu'à poids constant. Nous obtenons ainsi 250 mg de reineckate.

Résultats.

Nous calcinons 90,96 mg de ce sel ; il reste 16,34 mg de résidu, soit 17,9%₁₀ : calculé pour $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$: 17,4%₁₀ Cr_2O_3 .

En résumé.

La base extraite de la Patelle précipite donc sous forme de reineckate, de phosphotungstate et de periodure ayant les propriétés et la composition des sels correspondants de la bétaine. Comme la bétaine, elle résiste totalement à

l'oxydation permanganique acide à froid, elle est inattaquable par oxydation manganique alcaline à l'ébullition, elle est dégradée par oxydation persulfurique alcaline à l'ébullition en fournissant une partie de son azote à l'état de triméthylamine. Toutes ces similitudes sont en faveur de l'identité de cette substance et de la bétaine. Nous confirmons cette identité par chromatographie et électrophorèse sur papier.

VII. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

Nous utilisons le matériel précédemment décrit. L'extrait aqueux défêqué de Patelles renferme choline, glycérylphosphorylcholine et bétaine ; nous cherchons donc une phase solvante susceptible de séparer ces trois substances.

- phase solvante alcaline

Le mélange propanol - ammoniacque, eau (6-3-1) utilisé en phase descendante ou ascendante ne peut être employé, car la choline et la bétaine ont le même R_F .

- phase solvante acide

Nous employons le mélange butanol - éthanol - acide acétique - eau (8-2-1-3), déjà décrit en phase ascendante où les R_F divergent plus qu'en phase descendante.

Après séchage du chromatogramme, nous utilisons la solution de Dragendorff modifiée par Brégoiff (12), comme précédemment.

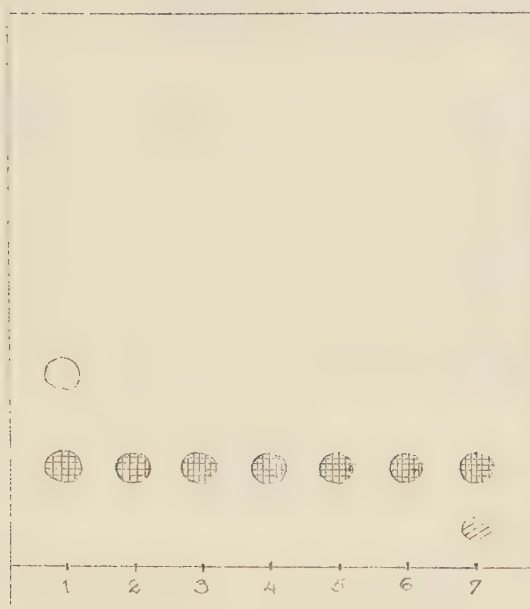


- 1 : Choline témoin
- 2 : Bétaïne témoin
- 3 : Choline + bétaïne

Avec les solutions témoins de choline et de bétaïne, nous obtenons une bonne séparation des spots.

Nous comparons la chromatographie :

- 1 - du chlorhydrate de bétaïne
- 2 - de l'iodure de la base
- 3 - du chlorure préparé à partir du reineckate acide après traitement par des solutions moléculairement équivalentes de sulfate d'argent et de chlorure de baryum.
- 4 - du carbonate préparé par destruction du phosphotungstate par la baryte et élimination du baryum en excès par le gaz carbonique.



- 1 : mélange témoin choline-bétaine
- 2 : iodure de la base de la Patelle
- 3 : reineckate acide de la base de la Patelle
- 4 : phosphotungstate de la base de la Patelle
- 5 : chlorhydrate de bétaine + iodure de la base de la Patelle
- 6 : iodure + reineckate + phosphotungstate de la Patelle
- 7 : solution purifiée de choline hydrosoluble combinée de la Patelle.

Conclusion.

Le chromatogramme montre :

- 1°) la bonne séparation des spots de choline et de bétaine (1)
- 2°) l'identité de la substance étudiée et de la bétaine, quelle que soit la forme de l'isolement : reineckate (3)
iodure (2)
phosphotungstate (4)
- 3°) qu'un mélange de bétaine et de substance de la Patelle ne donne qu'un seul et même spot (5).
- 4°) que le spot, différent de celui de la glycérylphosphorylcholine

qui apparaît par chromatographie de la solution purifiée de choline hydrosoluble combinée est bien celui de la bétaine (7).

VIII. ELECTROPHORESE SUR PAPIER.

Nous utilisons le matériel déjà décrit (voir p. 20).

Mode opératoire.

Nous obtenons les meilleurs résultats : migration suffisante des différentes substances, séparation satisfaisante des spots, spots bien définis, avec le tampon oxalate à pH 2,4 dont la composition est donnée page 20.

Les spots sont révélés à l'aide de la solution de Dragendorff, déjà utilisée.

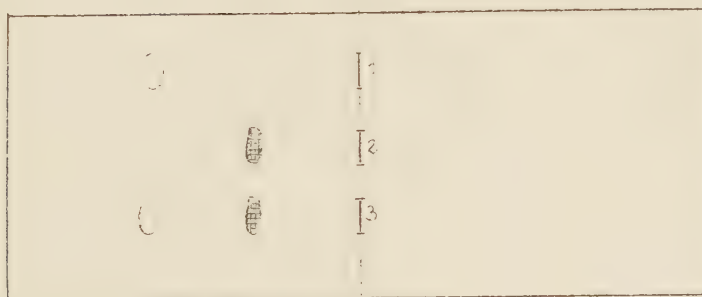
Nous soumettons à l'électrophorèse les solutions que nous avons chromatographiées :

- le chlorhydrate de bétaine synthétique
- l'iodure de la base de la Patelle
- le chlorure de la base de la Patelle
- le carbonate de la base de la Patelle

L'opération dure 1 h. 30 sous 400 Volts, avec une intensité d'une dizaine de μ A.

Résultats.

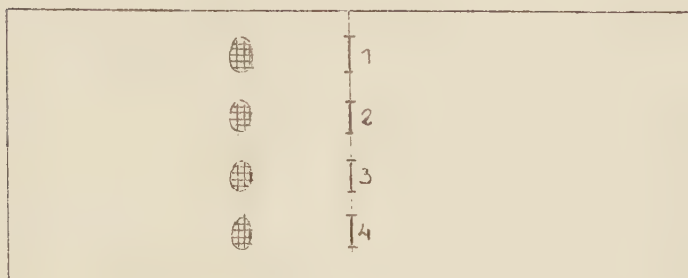
1) Solutions témoins



- 1- choline témoin
- 2- bétaine témoin
- 3- mélange choline bétaine

La séparation des spots de bétaine et choline est satisfaisante.

2) Solutions de bétaine synthétique et naturelle



- 1- bétaine témoin
- 2- iodure de la Patelle
- 3- iodure + chlorure + carbonate de la Patelle
- 4- iodure de la Patelle + bétaine témoin

Toutes ces solutions ont le même comportement.

Conclusion.

La bétaine et la substance triméthylammoniée de la Patelle se comportent de manière identique par chromatographie et par électrophorèse ; ces arguments ajoutés aux précédents nous permettent de conclure à l'identité des deux principes.

IX. TAUX ET REPARTITION DE LA BETAINE DANS LA PATELLE.

La bétaine dont nous avons établi la présence dans la Patelle, est séparée en premier lieu sous forme de "reineckate acide", or, celui-ci est très abondant : un extrait aqueux préparé à partir de 200 g d'animaux permet d'obtenir 5 g de reineckate sec, c'est-à-dire en moyenne 25 mg par gramme de Patelles sans coquilles. La molécule de reineckate contenant un $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]$ pour une molécule de base, nous pouvons évaluer grossièrement que la Patelle contient de 5 à 6 mg de bétaine par gramme, si nous considérons la totalité du "reineckate acide" comme du reineckate de bétaine.

Au moyen d'un dosage plus précis, nous confirmons cette teneur élevée.

1°. Dosage de la bétaine.

Différentes techniques permettent le dosage des sels de bétaine ; le reineckate peut être analysé par la méthode d'oxydation par le brome naissant après hydrolyse alcaline, mise au point par E. KAHANE et COUPECHOUX (44), mais le reineckate isolé de la Patelle n'est pas assez bien défini, ni surtout assez pur pour être utilisé comme matériel de dosage.

La méthode de WALKER (86) qui utilise la forte acidité des sels de bétaine pour un titrage par la soude en présence de rouge de méthyle, est certainement plus spécifique, mais nous préférons opérer d'après REIFER (73) et de HEUS (20) dont la méthode repose sur la précipitation de la bétaine en milieu acide sous forme de periodure, de formule $I_5 IN(CH_3)_3 CH_2 CO_2H$; Les 5 atomes d'iode libre sont titrés par l'hyposulfite. Cette méthode qui utilise le même principe que celui du dosage de choline nous est plus familière.

Mode opératoire.

Le periodure n'est pas précipité directement sur l'extrait aqueux déféqué de Patelles ; il faut éliminer la choline libre et isoler la bétaine de sa solution. Fidèle à nos méthodes, nous précipitons le reineckate, que nous transformons ensuite en periodure.

a) précipitation de reineckate.

Nous définissons les conditions dans lesquelles la précipitation du reineckate est quantitative, à l'aide d'une solution de chlorhydrate de bétaine synthétique.

Après une série d'expériences dans lesquelles nous faisons varier les concentrations en bétaine, en réactif, en acide et la durée du séjour en glacière, nous établissons ainsi les conditions de précipitation permettant d'obtenir des résultats quantitatifs et reproductibles :

5 à 10 mg de bétaine (exprimée en ion bétainium) en solution dans 5 à 20 cm³ d'eau, sont additionnés d'un volume égal de solution saturée de sel de Reinecke, le mélange est acidifié par plusieurs gouttes d'acide chlorhydrique concentré, et laissé une heure en glacière.

Nous opérons de même avec l'extrait de Patelles. A 5 cm³ correspondant à 3 g d'animaux, nous ajoutons 5 cm³ de réactif. Après un séjour de une heure en glacière, le reineckate de choline est éliminé par filtration ; le filtrat

et les eaux de lavage du précipité ($2 - 3 \text{ cm}^3$) réunis, sont acidifiés par une dizaine de gouttes d'acide chlorhydrique et additionnés de 10 cm^3 de solution de Reineckate d'ammonium. Après refroidissement, le précipité est centrifugé et lavé une fois par $2 - 3 \text{ cm}^3$ d'eau acidulée glacée.

b) précipitation du periodure.

Nous transformons ce reineckate en chlorure en le traitant par 7 cm^3 de solutions moléculairement équivalentes de sulfate d'argent et de chlorure de baryum. La solution de chlorure est amenée à 20 cm^3 .

Nous précipitons le périodure sur 2 cm^3 , en opérant de la manière suivante : nous ajoutons successivement dans un tube de centrifugeuse cylindro-cônique de 10 cm^3 :

- 1 cm^3 de chlorure de sodium à 30 p. 100, qui diminue la solubilité du periodure
- $0,5 \text{ cm}^3$ d'acide phosphorique à 85 p. 100, très doucement le long des parois du tube, de manière à obtenir une couche inférieure très acide qui protégera ultérieurement le précipité, au moment de la décantation et du lavage,
- 1 cm^3 d'un réactif ainsi préparé :

- iode 60 g
- iodure de potassium 120 g
- chlorure de sodium 100 g
- eau, quantité suffisante pour 1 litre.

Après un séjour de trois heures en glacière, nous centrifugeons et nous lavons 2 fois le periodure par $2 - 3 \text{ cm}^3$ d'eau à 0° , sans remise en suspension du précipité, puis nous le dissolvons dans 2 cm^3 d'alcool éthylique.

Nous dosons dans le tube même, les 5 atomes d'iode libre du periodure par l'hyposulfite N | 50 ; comme 5 atomes correspondent à 1 molécule de base, 1 cm^3 d'hyposulfite correspond à 0,472 mg de bétaine.

Nous exprimons les résultats en ion bétainium



de poids moléculaire 118.

Résultats.

Nous versons $4,34 \text{ cm}^3$ d'hyposulfite N | 50 qui correspondent à 2,00 mg de bétaine contenus dans 0,3 g de Patelles. Il y a donc 6,5 mg de bétaine par g.

d'animal, en accord avec ce que nous avons calculé d'après le poids de reineckate.

Conclusion.

La bétaine existe donc en grande quantité dans la Patelle et représente près de 2°|₀ des tissus secs. Ce taux voisin des plus élevés dans le règne végétal, où dans la betterave par exemple il est de 3°|₀, n'a jamais été trouvé jusqu'ici chez les animaux où il ne dépasse pas 1°|₀ dans les échantillons les plus riches, les animaux inférieurs notamment.

Nous observons que le dosage de la bétaine par pesée de son reineckate, plus rapide est suffisamment exact pour être utilisé lorsqu'une précision rigoureuse n'est pas indispensable. Dans la suite de notre étude sur la bétaine, c'est par cette méthode que nous déterminons les taux de bétaine.

2°. Forme de la bétaine dans la Patelle.

a) la bétaine existe sous forme libre.

Nous étudions et nous dosons la bétaine libre de l'extrait aqueux de Patelles ; dans l'hypothèse où la base existerait également sous une forme combinée, nous comparons les poids de reineckate obtenus à partir de prises aliquotes d'un même extrait, pour l'une directement, pour l'autre après attaque nitrique.

Mode opératoire.

Nous vérifions tout d'abord que la bétaine n'est pas dégradée au cours du traitement.

Nous traitons pendant 3 heures à l'ébullition dans une fiole à acétylation, 29,5 mg de reineckate de bétaine de la Patelle par 5 cm³ d'acide nitrique à 20 p. 100. Le liquide obtenu est additionné de 2 cm³ de sulfate ferrique à 50 p. 100 et neutralisé par 5 g. de carbonate de calcium. Après essorage et deux lavages à l'eau, le précipité d'hydroxydes de fer et de chrome est séparé et le liquide est concentré à 5 cm³. Sur cette solution, nous précipitons le reineckate en milieu acide ; nous en recueillons 28,7 mg ; le rendement de l'opération, 98°|₀, montre que l'acide nitrique utilisé dans ces conditions laisse la bétaine intacte.

Nous pouvons donc appliquer cette méthode d'hydrolyse et de purification.

Nous prélevons deux prises de 5 cm³ d'un même extrait de Patelles ; nous précipitons directement le reineckate acide de l'une, nous faisons subir l'hydrolyse nitrique à la seconde, puis nous y précipitons le reineckate.

Résultats.

Les deux reineckates pèsent respectivement 46,4 mg et 45,4 mg. La bétaine est donc sous forme libre dans la Patelle.

b) la bétaine n'est pas sous forme diffusible.

Nous observons que la bétaine n'est pas facilement diffusible dans les tissus de la Patelle, grâce à deux expériences.

a) par pression

Mode opératoire.

En débarrassant un lot de Patelles de leurs coquilles, nous recueillons 6,5 g de jus ; nous séparons les pieds des viscères.

Les muscles sont découpés en morceaux et pressés à l'aide d'un pilon ; nous obtenons :

- 4,5 g de liquide,
- 19 g de tissus.

Les 17 g de viscères sont laissés tels quels.

Résultats.

Nous réunissons les résultats dans le tableau III.

III.- ABSENCE DE BETAINES DANS LE JUS DE PRESSION DE LA PATELLE.

Matériel	Poids	mg reineckate	mg de bétaine par g.
jus d'ouverture	6,5	0	0
jus de pression du muscle	4,5	7	0,4
viscères	17	420	5,4
muscles pressés	19	392	5,75
animaux entiers	47	819	4,5

Il n'y a pas eu de diffusion de bétaine dans le jus.

b) par exsudation

Mode opératoire.

Nous débarrassons de leurs coquilles 100 g. de Patelles et nous éliminons les 6 g. de liquide recueilli, puisque nous avons vérifié dans l'expérience précédente qu'il est exempt de bétaine.

Nous plaçons les animaux, dont le poids est de 50 g. sur le fond d'un Buchner dont l'extrémité plonge dans un tube à essai ; nous plaçons l'ensemble dans un dessiccateur contenant un cristalliseur rempli d'éther. Au bout de quelques heures, nous recueillons 8,5 g. de jus exsudé par les tissus.

Résultats. (tableau IV).

IV.- ABSENCE DE BETAINE DANS LE JUS D'EXSUDATION
DES PATELLES -

Matériel	Poids	mg reineckate	mg de bétaine par g.
jus exsudé	8,5	6,7	0,17
animaux après exsudation	41,5	1 115	6,50
Animaux entiers	50	1 120	5

Conclusion.

La bétaine des tissus de la Patelle n'y est pas sous une forme facilement diffusible, puisqu'elle n'existe qu'à l'état de traces dans le liquide d'exsudation, qui représente cependant 17°|o du poids total de l'animal.

3°. Répartition de la bétaine dans les tissus de la Patelle.

Nous cherchons à localiser la bétaine dans les tissus de la Patelle ; dans ce but, nous précipitons le "reineckate acide" des extraits déféqués du muscle, des organes sexuels et des autres viscères. Ces déterminations sont faites sur 2 lots de Patelles ; les résultats exprimés en mg. par g. d'organes sont réunis dans le tableau ci-dessous (tableau V).

V.- REPARTITION DE LA BETAINE DANS LES DIFFERENTS
ORGANES DE LA PATELLE

Organes	Bétaine en mg par g.	
Animal entier	5,6	5,2
Muscle	4,7	5,1
Organes sexuels	5,6	4,8
Viscères	5,1	

La bétaine est donc uniformément répartie dans tous les tissus de la Patelle.

Conclusion.

Nous isolons à partir de l'extrait aqueux de Patelles, un reineckate acide d'une substance triméthylammoniée que nous identifions à la bétaine par l'étude de ses propriétés et celles de la composition de son iodure.

Nous montrons que le phosphotungstate est un sel mal défini dont la composition varie avec les conditions de précipitation.

Les différents organes de la Patelle contiennent une quantité exceptionnellement élevée de bétaine, 6 mg par g. d'animal ; celle-ci est sous forme libre, facilement extractible par l'eau bouillante, mais elle est peu diffusible.

TROISIEME CHAPITRE

LES LIPIDES DE LA PATELLE.

Nous avons précédemment observé que la Patelle contient une quantité de glycérylphosphorylcholine particulièrement élevée ; la bétaine qui n'y avait jamais été signalée y atteint un taux supérieur à tout ce qui a été trouvé jusqu'ici dans le règne animal ; ces deux principes participent vraisemblablement d'une manière plus ou moins directe au métabolisme de l'animal et notamment à des réactions dans lesquelles les lipides doivent jouer un rôle important. Nous nous proposons donc d'étudier ceux-ci afin de montrer s'ils ont une composition normale ou s'ils présentent aussi des singularités.

I. TECHNIQUES.

Nous analysons les lipides de l'animal entier, du muscle et des viscères.

1°. Extraction des lipides totaux.

Par la méthode de KUMAGAWA (54) : l'extraction est faite sur l'animal entier et non sur les tissus préalablement broyés au sein de l'alcool. Une vingtaine de grammes de Patelles sans coquilles sont introduits dans la cartouche d'un appareil de Kumagawa de 250 cm³ et extraits par 100 cm³ d'alcool absolu pendant 8 heures.

Par la méthode de BLOOR (7) : 20 à 30 g. de Patelles sans coquilles sont broyés dans le bol d'un Turmix en présence de 50 cm³ d'un mélange éther-alcool (1|1). Le broyat additionné de 50 cm³ du même mélange solvant est extrait pendant deux heures au bain-marie bouillant. Nous séparons la solution éthéro-alcoolique des tissus par filtration. Ceux-ci sont remis en suspension dans 50 cm³ d'éther-alcool et extraits à nouveau une demi-heure ; l'opération est répétée trois ou quatre fois.

Les solutions éthéro-alcooliques qui contiennent les lipides totaux sont évaporées ; le résidu est desséché sous pression réduite, dans un dessiccateur garni de pastilles de potasse. Nous le traitons ensuite par de petites portions

de chloroforme à chaud (3) que nous filtrons sur verre fritté G₃ recouvert d'une mince couche d'hyflosupercels qui facilite l'opération. La solution chloroformique finale est de 25 cm³.

2°. Dosages.

a) choline

Une prise aliquote de l'extrait chloroformique est évaporée et le résidu traité par 5 cm³ d'acide nitrique à 20 p. 100 pendant trois heures à l'ébullition. Le dosage se fait sur l'hydrolysate neutralisé, déféqué par l'hydroxyde ferrique et concentré, suivant la technique précédemment décrite.

b) phosphore

Nous dosons le phosphore comme précédemment (voir page 7)

c) azote

Nous dosons l'azote par Kjeldahl (voir page 7)

d) cholestérol

- cholestérol total

Pour le dosage du cholestérol nous utilisons la réaction d'acétylation de LIEDERMANN. Certains auteurs ne sont pas satisfaits d'un dosage direct et notamment SPERRY (80) qui préconise pour le dosage du cholestérol total une saponification préalable par la soude, puis la séparation du cholestérol ainsi libéré sous forme de complexe avec la digitonine en solution alcoolique ; c'est sur le complexe cholestérol-digitonine que se fait l'acétylation, suivant la technique de DELSAL (21).

Pour doser le cholestérol des lipides de la Patelle, nous ne sommes pas passés par l'intermédiaire du complexe et nous avons opéré de la manière suivante à une prise aliquote de la solution chloroformique des lipides totaux contenant de 0,5 à 1,5 mg de cholestérol, amenée à 5 cm³, nous ajoutons 2 cm³ d'anhydride acétique et 5 gouttes d'acide sulfurique (densité 1,83). Après agitation et 30 à 45 minutes de repos, il se développe une coloration verte que nous évaluons au diffusio-absorptiomètre de Dognon, par comparaison avec une gamme-étalon.

- cholestérol estérifié

Le cholestérol libre forme avec la digitonine un complexe insoluble dans

l'eau, l'alcool, et l'acétone ; après élimination de ce complexe il est possible de doser le cholestérol estérifié en utilisant la méthode précédente.

Une prise aliquote de la solution chloroformique est évaporée et le résidu dissous dans 10 cm³ d'un mélange eau-alcool-acétone (18-9-73). Nous ajoutons 3 cm³ de solution de digitonine (0,5 g. pour 100 cm³ du mélange précédent) à l'ébullition. Le complexe précipite par refroidissement. Après élimination de ce complexe, nous vérifions qu'une nouvelle addition de réactif ne produit pas de précipitation supplémentaire.

Les solutions mères sont évaporées ; nous dissolvons le résidu dans le chloroforme et nous dosons le cholestérol estérifié par colorimétrie.

e) acides gras

Après évaporation du solvant, nous saponifions une prise aliquote de la solution des lipides totaux, par 10 cm³ d'une solution de potasse alcoolique à 5 p. 100, pendant huit heures à l'ébullition (57). La solution alcoolique suffisamment diluée par de l'eau distillée et amenée à 100 cm³ environ est transvasée dans une ampoule à décantation ; elle est débarrassée de la fraction insaponifiable par trois extractions successives par 20 cm³ d'éther de pétrole ; cet éther de pétrole est lavé une fois par 20 cm³ d'eau distillée ; cette portion est ajoutée à la solution alcoolique-aqueuse des savons d'acides gras ; ceux-ci sont libérés de leurs sels par acidification par 2-3 cm³ d'acide chlorhydrique concentré, puis extraits trois fois par 20 cm³ d'éther ordinaire qui est ensuite lavé à l'eau distillée jusqu'à disparition de l'acidité. Cet éther est évaporé sous pression réduite et le résidu est desséché dans un dessiccateur contenant des pastilles de potasse. Il est ensuite traité à chaud par 5 cm³ d'éther de pétrole qui est filtré, après refroidissement, sur un mélange d'amiante et de sable de Fontainebleau.

L'éther de pétrole est évaporé ; le résidu est desséché en dessiccateur sous pression réduite, en présence de potasse à 60°, pendant huit heures. Les acides gras sont alors pesés, dissous dans 10 cm³ d'alcool neutralisé et titrés par une solution de potasse N/50, en présence de phénol -phtaléine.

II. ETUDE DES LIPIDES TOTAUX.

1°. Comparaison des méthodes d'extraction.

Dans nos premières expériences, nous utilisons simultanément la méthode de BLOOR et de KUMAGAWA ; pour des raisons de commodité, les extraits suivants sont préparés uniquement par la méthode de BLOOR. Au préalable nous vérifions que l'extraction est identique dans les deux cas et que son rendement est satisfaisant.

Principe -

Nous comparons la quantité de choline non hydrosoluble et la quantité de choline lipidique contenues dans un gramme d'animal frais sans coquille.

La choline totale, qui correspond à la somme de la choline hydrosoluble (glycérylphosphorylcholine et traces de choline libre) et de la choline non hydrosoluble est dosée sur l'animal entier ; la choline hydrosoluble est dosée sur un extrait aqueux déféqué de la Patelle. Par différence, nous évaluons la choline non hydrosoluble. Cette valeur est comparée à celle de la choline lipidique obtenue par dosage direct sur la solution des lipides extraits.

Mode opératoire -

Les lipides totaux de deux lots de 30 g. de Patelles sont extraits pour l'un par la méthode de BLOOR et pour l'autre par celle de KUMAGAWA. En fin d'opération, nous obtenons pour chacun une solution chloroformique de 25 cm³.

La choline lipidique est dosée après hydrolyse nitrique de 2 cm³ de chacune des solutions.

D'autre part, nous dosons la choline totale contenue dans 2,5 g d'animaux et la glycérylphosphorylcholine de l'extrait aqueux déféqué préparé à partir de 5 g. de Patelles. Par différence, nous calculons la choline non hydrosoluble.

Résultats -

Les valeurs sont exprimées en mg. et rapportées au gramme d'animal sans coquille (tableau VI).

Ce tableau montre que les quantités de choline lipidique extraites dans les deux opérations sont les mêmes ; nous pouvons donc utiliser l'une ou l'autre technique. En outre, la teneur en choline lipidique par gramme d'animal correspond sensiblement à celle de la choline non hydrosoluble.

VI.- CHOLINE LIPIDIQUE EXTRAITE PAR LA METHODE DE BLOOR
ou de KUMAGAWA -

Technique	Choline lipidique en mg. par g.
Floor	0,49
Kumagawa	0,50
calculé par dif- férence	0,52

2°. Choline non hydrosoluble et choline lipidique.

Ces deux formes de choline s'identifient-elles l'une à l'autre ? En d'autres termes, la totalité de la choline non hydrosoluble est-elle extractible par les solvants des lipides ?

Pour examiner avec plus de soin le rapport du dosage par différence et du dosage direct, nous avons extrait les lipides de l'animal entier, des viscères et du muscle de différents lots de Patelles, par la méthode de BLOOR (tableau VII).

VII.- CHOLINE NON HYDROSOLUBLE ET CHOLINE LIPIDIQUE EXTRAITE DE
L'ANIMAL ENTIER, DES VISCERES ET DU MUSCLE, en mg. par g.

Animal entier			Viscères			Muscle		
choline non hy- drosolu- ble.	choline lipidi- que	Ecart	choline non hy- drosolu- ble.	choline lipidi- que	Ecart	choline non hy- drosolu- ble	choline lipidi- que	Ecart
0,595	0,500	- 0,095	0,525	0,520	- 0,005	0,745	0,515	- 0,230
0,540	0,605	+ 0,065	0,685	0,565	- 0,120	0,565	0,410	- 0,155
0,605	0,580	- 0,025	0,660	0,580	- 0,080	0,585	0,230	- 0,255
0,665	0,555	- 0,110	0,680	0,545	- 0,135	0,285	0,325	+ 0,040
0,520	0,515	- 0,005				0,330	0,350	+ 0,020
0,665	0,455	- 0,210				0,440	0,360	- 0,080
0,500	0,490	- 0,010				0,770	0,650	- 0,120
0,545	0,425	- 0,120				0,600	0,515	- 0,085
0,650	0,450	- 0,200						

Ce tableau montre qu'il n'y a pas toujours accord satisfaisant entre les valeurs de la choline non hydrosoluble et celles de la choline lipidique ; le désaccord est surtout accentué dans le cas du muscle.

Dans l'état actuel de notre travail, il ne nous est pas permis d'affirmer avec certitude l'identité des deux formes, mais l'écart observé est loin de signifier que la totalité de la choline non hydrosoluble n'est pas lipidique. En effet, les écarts sont tantôt positifs, tantôt négatifs, ils sont très variables et peuvent être dûs uniquement à des causes accidentelles : erreurs analytiques d'autant plus accusées qu'il s'agit de la comparaison d'un dosage direct et d'un dosage par différence ; erreurs dans les prélèvements, dues à l'hétérogénéité des tissus analysés.

Quant au sort de la choline hydrosoluble au cours de l'extraction des lipides, nous observons que la glycérylphosphorylcholine n'est pas extraite intégralement dans ce mode opératoire, une partie se trouve dans le résidu d'extraction par l'alcool ou l'éther-alcool, une autre dans le résidu insoluble dans le chloroforme.

Nous comparons la glycérylphosphorylcholine dosée directement et celle calculée par addition des quantités trouvées dans les deux résidus.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau VIII.

VIII.- SORT DE LA GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE AU COURS
DE L'EXTRACTION DES LIPIDES. -

	glycérylphosphorylcholine exprimée en mg. par g.		
	Kumagawa	Bloor	Dosage direct
Dans les tissus épuisés (alcool ou alcool-éther)	1,275	1,180	
Dans l'insoluble dans le chloroforme	1,200	1,130	
Total	2,475	2,310	2,575

3°. Taux des lipides totaux.

Le taux des lipides totaux de l'animal entier, des viscères et du muscle, est obtenu par pesée de l'extrait sec de prises aliquotes de la solution chloroformique.

Mode opératoire -

5 à 10 cm³ de l'extrait des différents organes sont évaporés. Le résidu est desséché jusqu'à poids constant, sous pression réduite, dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique.

Résultats -

Les valeurs obtenues sont réunies dans le tableau IX.

IX.- LIPIDES TOTAUX DE L'ANIMAL ENTIER, DES VISCÈRES
ET DU MUSCLE

Extrait lipidique en mg/g de tissus frais		
Animal entier	Viscères	Muscles
36	84	11
33	89	13
39	92	12
37	91	9
35		10
30		
28		
27		
Moyenne	89	11

Le taux de lipides totaux est sensiblement le même dans les différentes séries de déterminations, mais il très différent pour le muscle et l'ensemble des viscères de l'animal. Il est en moyenne de 36 mg. par g. d'animal total, de 90 mg par g. de viscères et 10 mg. par g. de muscle (rapporté au poids frais), TSUJUMOTO (84) qui étudie les lipides des Gastéropodes, évalue à 1 % environ le taux des lipides totaux, rapporté au poids frais. Chez la Patelle, il est donc supérieur, puisqu'il est environ de 3,6 %.

Par dessiccation à l'étuve à 100°, jusqu'à poids constant, nous observons que la matière sèche constitue environ 30% du poids des tissus frais.

Dans l'animal entier, les lipides totaux représentent donc près de 12°|o du poids sec ; s'ils ne sont que de 3°|o dans le muscle, ils atteignent 30°|o dans les viscères et constituent donc une part importante des organes.

4°. Composition des lipides totaux.

a) cholestérol

Nous dosons le cholestérol total des extraits précédemment décrits.

Les valeurs sont réunies dans le tableau X.

X.- CHOLESTEROL DE L'ANIMAL ENTIER, DES VISCERES ET DU MUSCLE -

	Cholestérol en mg. par g.
Animal entier	2,75
Viscères	4,10
Muscles	1,10

Les viscères sont plus riches que le muscle en cholestérol ; il représente 0,4°|o du poids des tissus frais, soit plus de 1°|o du poids sec.

Après avoir éliminé le complexe formé par le cholestérol et la digi-tonine, nous n'observons pas de réaction de Liebermann positive. Le cholestérol des tissus de la Patelle est donc entièrement sous forme libre.

b) acides gras

Les acides gras obtenus à partir de prises aliquotes des solutions chloroformiques, sont pesés, puis après dissolution dans l'alcool neutre, ils sont titrés par une solution aqueuse de potasse N|50, en présence de phénol-phtaléine.

Les résultats sont réunis dans le tableau XI.

Ces dosages montrent :

- 1°) que le poids moléculaire moyen des acides gras est voisin de 300
- 2°) que leur taux est très différent dans le muscle et dans les viscères. C'est dans ceux-ci qu'il est le plus élevé ; voisin de 4,5°|o du poids frais, il atteint presque 15°|o de la matière sèche.

XI .- ACIDES GRAS DE L'ANIMAL ENTIER, DES VISCERES
ET DU MUSCLE

Poids d'organe	Acides gras en mg.	KOH N 50 versée en cm ³	Poids molécu- laire.	Acides gras en mg g
3,5 g animal entier	52	8,03	323	15
1 g viscères	43,5	7,35	295	43,5
10,45 g muscle	41,5	6,55	310	4

c) phosphore, azote et choline

Après avoir observé que dans plusieurs extraits lipidiques de l'animal entier et des viscères, la choline lipidique exprimée en mg. par g. de tissu est sensiblement constante, nous y avons dosé l'azote et le phosphore.

Les résultats sont réunis dans le tableau XII.

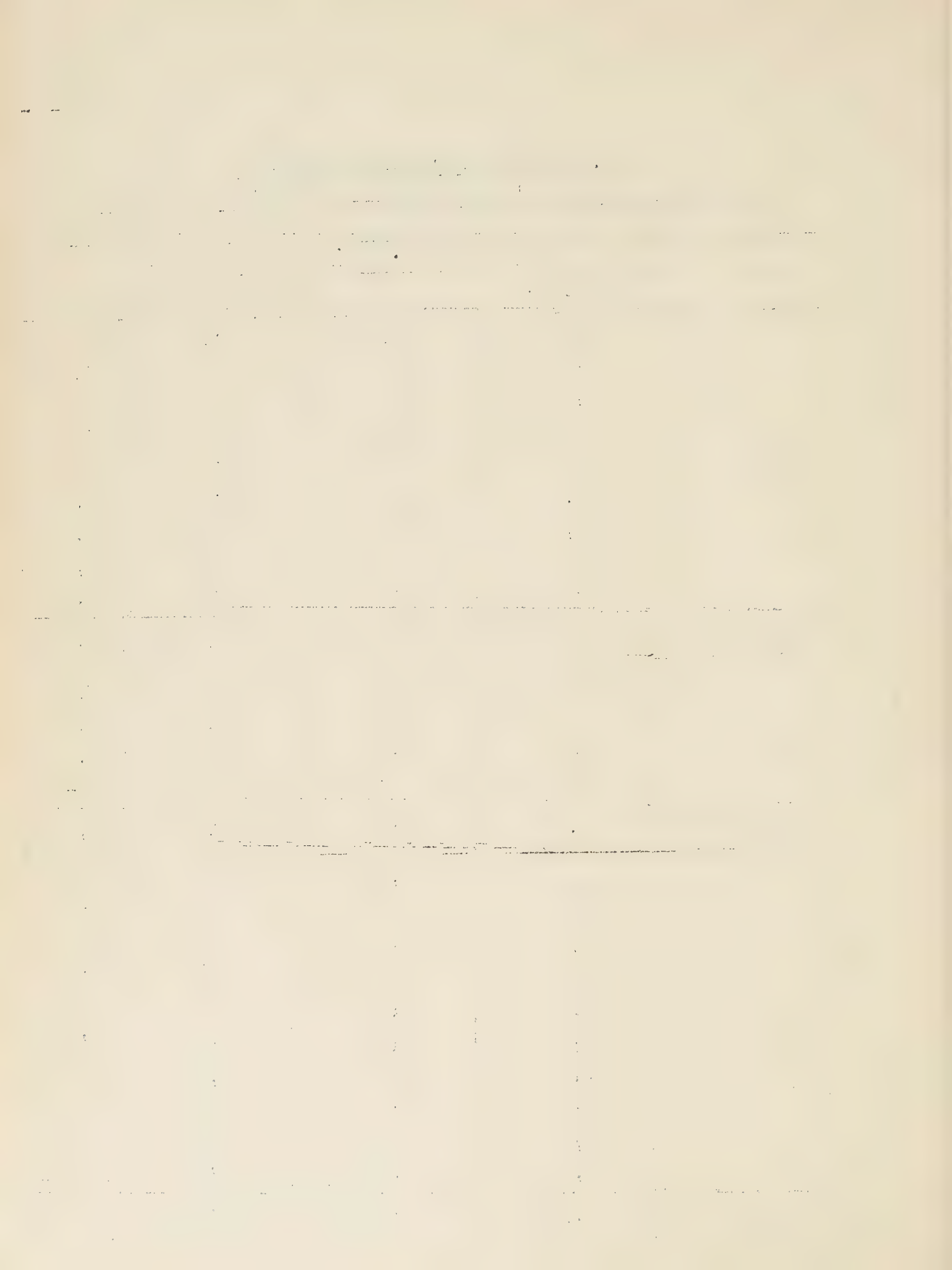
Les teneurs en azote et en phosphore sont sensiblement les mêmes dans les solutions lipidiques de l'animal entier et des viscères, mais leurs variations se font dans un sens identique à celui de la choline lipidique dans le muscle. Quel que soit l'organe, le rapport N|P est très élevé et est compris entre 3,30 et 4.

Conclusion -

Les viscères de la Patelle ont le taux le plus élevé de lipides totaux, de cholestérol et d'acides gras, qui représentent respectivement 30°|o, 1°|o et 15°|o du poids des tissus secs.

XII.- LA CHOLINE, L'AZOTE ET LE PHOSPHORE
LES LIPIDES TOTAUX DE L'ANIMAL ENTIER, LES VISCÈRES ET LE MUSCLE.

Matériel	en mg. par g.			N P
	chol. lip.	N	P	
Animal entier	0,500	0,395	0,240	3,55
	0,605	0,445	0,360	2,70
	0,580	0,435	0,285	3,50
	0,555	0,400	0,240	3,70
	0,515	0,415	0,310	3,05
	0,570	0,440	0,350	2,90
	0,490	0,380	0,235	3,65
	0,425	0,370	0,235	3,55
	0,450	0,395	0,255	3,40
Moyenne	0,520	0,400	0,280	3,30
Viscères	0,520	0,455	0,265	3,80
	0,565	0,405	0,255	3,55
	0,580	0,520	0,305	3,75
	0,545	—	0,255	—
Moyenne	0,550	0,460	0,270	3,70
Muscle	0,390	0,430	0,240	3,95
	0,515	0,350	0,240	3,65
	0,410	0,360	0,175	4,05
	0,230	0,230	0,100	5,15
	0,325	0,310	0,155	4,75
	0,355	0,330	0,203	3,80
	0,460	0,630	0,215	4,10
	0,650	0,560	0,310	4,00
	0,315	0,300	0,130	5,05
	0,300	0,205	0,205	3,80
Moyenne	0,415	0,375	0,195	3,95



III. ETUDE DES PHOSPHATIDES.

Pour étudier les phosphatides, nous travaillons sur un seul échantillon moyen résultant du mélange de plusieurs extraits chloroformiques de l'animal entier, des viscères et du muscle, dont l'analyse est donnée dans le tableau XIII.

XIII.- LA CHOLÈRE LIPIDIQUE, D'AZOTE ET LE PHOSPHORE D'UN ÉCHANTILLON MOYEN DES LIÈGES TOTALS DE L'ANIMAL ENTIER, DES VISCÈRES ET DU MUSCLE -

Matériel	en mg. par g.			N P
	Chol. lip.	N	P	
Animal entier	0,560	0,435	0,280	3,60
Viscères	0,530	0,450	0,290	3,50
Muscle	0,400	0,310	0,185	3,70

1°. Isolément.

Pour isoler les phosphatides des lipides totaux, nous utilisons leur insolubilité dans l'acétone. L'extrait chloroformique est additionné d'acétone en quantité suffisante pour précipiter le maximum de phosphatides, en présence de quelques gouttes d'une solution alcoolique saturée de chlorure de magnésium.

Nous définissons au préalable les conditions qui permettent un rendement satisfaisant de l'opération.

D'après BLOOR (8), l'échantillon doit contenir 4 à 6 mg. de phosphatides ; si la teneur est inférieure à 2 mg. la précipitation n'est pas quantitative. Sur des portions aliquotes de la solution chloroformique, nous faisons une série d'expériences dans lesquelles varient les phosphatides exprimés par leur phosphore, les quantités d'acétone et de chlorure de magnésium.

a) concentration en phosphore et en acétone

Les meilleurs résultats sont obtenus en précipitant 1 cm³ de solution contenant de 0,5 à 1 mg. de phosphore, par 7 volumes d'acétone refroidie à 0°, en présence de chlorure de magnésium.

b) influence du chlorure de magnésium

Nous observons que, suivant les quantités de chlorure de magnésium, le rapport N|P du précipité des phosphatides est différent. Les expériences portent sur 5 cm³ d'extrait contenant 3,625 mg de phosphore, additionnés de 35 cm³ d'acétone ; les quantités de solution de chlorure de magnésium sont variables. Nous calculons le rapport N|P et le rendement de l'opération par rapport au phosphore. Le rapport N|P de l'extrait lipidique primitif est égal à 3,60 (tableau XIV).

XIV.- VARIATIONS DU RAPPORT N|P AVEC LA QUANTITE
DE CHLORURE DE MAGNESIUM.-

Chlorure de Magnésium en cm ³	N P	Rendement ° o
0	2,65	30
0,10	3,05	60
1,50	4,00	80

Dans la dernière expérience, le précipité est collant, difficile à centrifuger.

Il faut donc utiliser une quantité de chlorure de magnésium telle que le rendement soit amélioré, mais qu'il y ait le moins d'entraînement possible de substances azotées non lipidiques.

c) précipitations successives

Afin de purifier les phosphatides, après une première précipitation, ceux-ci sont généralement dissous dans le minimum de solvant et précipités une seconde fois. L'opération peut être répétée une troisième fois.

Ce traitement n'est pas applicable aux phosphatides de la Patelle parce que comme le montrent les chiffres du tableau XV, le rapport N|P de 3,60 dans l'extrait primitif, n'est que de 3,05 dans le premier précipité, mais il est de 3,25 après une précipitation supplémentaire.

Le rendement calculé par rapport au phosphore, s'il est de 60°|o au cours de la première opération, n'est plus que de 30°|o à la seconde. Il n'y a donc pas intérêt à répéter les précipitations.

XV.- RENDEMENT DES PRECIPITATIONS SUCCESSIVES DES PHOSPHATIDES

	Rendement	N P
Solution primitive		3,6
1ère précipitation	60% ₁₀	3,05
2ème précipitation	30% ₁₀	3,25

En résumé -

Les conditions permettant d'isoler les phosphatides d'un extrait lipidique, avec un rendement satisfaisant sont les suivantes :

A 1 cm³ de solution chloroformique contenant de 0,500 à 1 mg. de phosphore, sont ajoutés 7 cm³ d'acétone à 0°, en présence de 1 goutte de solution alcoolique saturée de chlorure de magnésium. Après un séjour d'une dizaine d'heures en glacière, le précipité de phosphatides est centrifugé, lavé par quelques cm³ d'acétone. - Après dessiccation sous pression réduite dans un dessiccateur contenant de l'acide sulfurique, le précipité est dissous dans de l'éther sulfurique.

d) lavage des phosphatides

Dès 1912, MAC LEAN (62) signale que les phosphatides sont accompagnés de substances azotées phosphorées non lipidiques.

Quelques années plus tard, Le Breton (56) établit que le phosphore éthéro-soluble est en excès par rapport au phosphore phosphatidique "vrai".

Plusieurs auteurs observent le même phénomène et cherchent à éliminer ces principes étrangers aux lipides ; J. CLEMENT (17) dans un travail récent examine les différents procédés employés et définit les conditions de lavage des phosphatides qui éliminent ces "impuretés". Ayant observé que nos phosphatides ont un rapport N|P particulièrement élevé, nous tentons de les purifier en utilisant la technique de J. CLEMENT.

Mode opératoire -

Les phosphatides en solution dans l'éther sulfurique sont introduits dans une ampoule à décantation et lavés trois fois par une solution contenant 1 g. de chlorure de sodium et 0,5 g. de chlorure de magnésium pour 100 cm³ d'eau ;

la solution aqueuse est éliminée par décantation, après au moins une demi-heure de repos. Les liquides de lavage sont extraits de nouveau trois fois à l'éther ordinaire ; celui-ci est réuni à la précédente solution étherée.

La totalité des phosphatides se trouve dans l'éther ; les eaux de lavage doivent contenir les substances non lipidiques pour lesquelles J. CLEMENT émet l'hypothèse de leur identité à des esters phosphoriques ou glycérophosphoriques de colamine et de choline.

Nous cherchons si cette solution saline renferme de tels principes.

Sur une fraction aliquote, nous dosons le phosphore et sur une autre la choline, directement et après hydrolyse nitrique.

Résultats -

La recherche de la choline et du phosphore est négative, ce qui signifie que les phosphatides de la Patelle ne sont pas souillés par des substances azotées analogues à celles décrites par l'auteur déjà cité, en dépit de l'exceptionnelle abondance de la glycérylphosphorylcholine.

2°. Analyse des phosphatides bruts.

a) taux des phosphatides

Pour déterminer le taux des phosphatides, nous desséchons sous pression réduite, jusqu'à poids constant, une prise aliquote de la solution (tableau XVI).

XVI.- LES PHOSPHATIDES DE L'ANIMAL ENTIER, DES VISCÈRES ET DU MUSCLE.-

	Phosphatides en mg par g.
Animal entier	10,8
Viscères	20,6
Muscle	6,4

Les viscères sont les organes les plus riches en phosphatides ce qui est en accord avec ce que nous avons observé précédemment.

b) les phosphatidylcholines

Nous dosons la choline, l'azote et le phosphore des phosphatides de l'animal entier, des viscères et du muscle (tableau XVII).

Dans ce tableau nous comparons la composition des lipides totaux et des phosphatides.

XVII.- LA CHOLINE, L'AZOTE ET LE PHOSPHORE DES PHOSPHATIDES
DE L'ANIMAL ENTIER, DES VISCERES ET DU MUSCLE

	exprimé en mg. par g. d'animal			N P
	Choline lipidi- que.	N	P	
<u>Animal entier</u>				
- Lipides totaux	0,480	0,435	0,280	3,60
- Phosphatides isolés	0,325	0,195	0,155	2,35
Rendement 56 %				
<u>Viscères</u>				
- Lipides totaux	0,550	0,450	0,290	3,50
- Phosphatides isolés	0,280	0,175	0,155	2,45
Rendement 53 %				
<u>Muscle</u>				
- Lipides totaux	0,400	0,310	0,175	3,70
- Phosphatides isolés	0,290	0,165	0,110	3,25
Rendement 60 %				

Ces chiffres montrent :

- que dans la meilleure opération le rendement n'est pas supérieur à 60 %.

- que le rapport N|P est très élevé puisque voisin de 3, alors que les phosphatides purifiés habituels ont pour ce même rapport une valeur voisine de l'unité. Les phosphatides de la Patelle sont donc accompagnés de substances azoté

non lipidiques, qui ne peuvent être éliminées dans les conditions définies par J. CLEMENT pour les tissus des Mammifères.

D'autre part, si nous rapportons le poids d'azote, de phosphore et de choline au poids des phosphatides (tableau XVIII), nous constatons que dans les viscères, l'azote, le phosphore et la choline ne représentent qu'un faible pourcentage des phosphatides bruts, qui sont particulièrement impurs.

XVIII.- COMPOSITION CENTESIMALE DES PHOSPHATIDES

	N %	P %	Choline %
Animal entier	1,8	1,4	3,0
Viscères	0,8	0,7	1,4
Muscle	2,6	1,7	4,5

Dans le muscle, le pourcentage de phosphore est très supérieur, mais il reste cependant anormalement faible, inférieur à ce qu'il est dans les phosphatides habituels où il est voisin de 4.

Les phosphatides semblent d'ailleurs avoir une importance plus grande dans le muscle que dans les autres organes. Si nous examinons la composition centésimale des lipides totaux de l'animal entier, des viscères et du muscle, nous observons que les glycérides et les phosphatides constituent la majeure partie de ces lipides et qu'ils sont en quantités variables suivant les organes de l'animal. Si les viscères sont les organes les plus riches en acides gras, le muscle contient une quantité de phosphatides plus de deux fois supérieure à celle des viscères (tableau XIX).

Les phosphatides représentent donc une fraction importante des constituants du muscle, ce qui est à rapprocher de leur teneur en glycérylphosphorylcholine beaucoup plus élevée que celle des viscères.

XIX.- COMPOSITION CENTRALE DES LIPIDES TOTAUX DE L'ANIMAL ENTIER,
DES VISCERES ET DU MUSCLE -

	Animal entier		Viscères		Muscle	
	mg/g tissus frais.	% des lipides	mg/g tissus frais.	% des lipides	mg/g tissus frais.	% des lipides
Lipides totaux	36		89		11	
Acides gras	15	41	45,5	48,8	4	36,3
Cholestérol	0,57	7	4,1	4,5	1,1	10
Esters du cholestérol	0	0	0	0	0	0
Phosphatides	10,6	30	20,6	23,1	6,4	58
Phosphore	0,26	0,8	0,29	0,3	0,185	1,7
Azote	0,455	1,2	0,45	0,5	0,3	2,8
Choline	0,56	1,5	0,53	0,6	0,4	3,7

5°. Substances azotées qui accompagnent les phosphatides.

Nous avons précédemment montré que les phosphatides de La Patelle possèdent un rapport N|P anormalement élevé, voisin de 3, et que les substances azotées qui les accompagnent ne peuvent être éliminées par la technique de lavage décrite par J. CLEMENT (17) (voir ci-dessus).

Nous nous proposons de rechercher si l'inefficacité du traitement est due à la nature particulière des phosphatides ou à celle de ces "impuretés".

a) ce sont des substances azotées non phosphorées.

Mode opératoire -

20 cm³ de solution chloroformique de phosphatides de l'animal entier contenant 8 mg. de phosphore et 9,4 mg. d'azote et dont le rapport N|P est donc de 2,6, sont traités par 20 cm³ d'eau et 5 cm³ de sulfate ferrique. La totalité du liquide est portée à l'ébullition jusqu'à disparition totale du chloroforme. Après neutralisation par 7 g. de carbonate de calcium, le mélange est essoré et le précipité est lavé avec soin ; dans ces conditions les phosphatides sont adsorbés par l'hydroxyde de fer et la fraction hydrosoluble passe en solution.

Le filtrat et les eaux de lavage réunis sont concentrés jusqu'à 10 cm^3 . Sur 1 cm^3 et 4 cm^3 de cette solution, nous recherchons le phosphore et la choline ; les résultats sont négatifs.

Les phosphatides ne sont donc pas accompagnés d'esters phosphorique ou glycérophosphorique de choline, entraînés au cours des opérations ou résultant de la dégradation des phosphatidylcholines.

Nous observons en outre, que la bétaine n'accompagne pas les phosphatides puisque 1 cm^3 de la solution précédemment préparée ne donne aucun précipité par addition de sel de Reinecke en milieu acide.

b) ce sont des acides aminés

Sur les 4 cm^3 restants de la solution déféquée, nous donnons $0,845\text{mg}$ d'azote, soit $2,10\text{ mg.}$ pour la totalité de l'échantillon. Par différence nous estimons que le précipité contenant la totalité des phosphatides retient $7,3\text{ mg.}$ d'azote, ce qui conduit à un rapport N|P égal à 2, à peine moins anormal que celui des phosphatides bruts.

Un traitement identique appliqué à des solutions chloroformiques de phosphatides du muscle et des viscères, aboutit à des résultats voisins du précédent.

Les résultats obtenus sont constants. En effet, dans une nouvelle opération portant sur un extrait contenant $5,5\text{ mg.}$ de phosphore et $7,2\text{ mg.}$ d'azote (rapport N|P de 2,9), déféqué comme ci-dessus par du sulfate ferrique, nous dosons dans le liquide de défécation $2,7\text{mg.}$ d'azote hydrosoluble ; $4,5\text{ mg.}$ d'azote restent donc sur le précipité renfermant les phosphatides dont le rapport N|P n'est plus que de 1,85.

Une troisième expérience portant sur un échantillon contenant 9 mg. de phosphore et $10,8\text{ mg.}$ d'azote (rapport N|P de 2,65) permet d'éliminer $2,6\text{ mg.}$ d'azote non lipidique ; les phosphatides adsorbés ne renferment donc plus que $6,2\text{ mg.}$ d'azote et le rapport N|P est alors de 2,05.

Les substances azotées qui sont en solution dans le liquide de défécation ne font évidemment pas partie des phosphatides. Elles s'éliminent difficilement au cours des extractions et des lavages habituels.

De nombreux auteurs ont signalé la présence d'impuretés azotées dans

les extraits lipidiques et elles sont connues depuis les travaux de VAN SLYKE et FOLCH (32), ainsi que de CHRISTENSEN (16) ; il s'agit de l'urée et des acides aminés.

Nous avons précédemment montré (chapitre premier) que l'extrait aqueux déféqué de la Patelle est riche en acides aminés ; il n'est pas invraisemblable qu'une partie de ceux-ci puisse accompagner les lipides au cours de leur extraction et qu'ils soient ensuite entraînés par la précipitation acétonique. Nous observons que la solution obtenue ci-dessus, après défécation ferrique donne une réaction positive à la ninhydrine. Les phosphatides de la Patelle sont donc souillés par des acides aminés.

c) élimination des acides aminés

Afin d'éliminer ces acides aminés, nous utilisons une colonne de poudre de cellulose, suivant la technique décrite par LEA et RHODES (35).

Mode opératoire -

La poudre de cellulose Whatman du commerce ('Ashless powder chemically prepared') est passée au tamis 80. Cette fraction est mise en suspension dans l'éther ordinaire et introduite dans une colonne de verre de 2 cm de diamètre, ayant une extrémité effilée, sur une hauteur de 12 cm. La colonne est lavée par 25 cm³ d'éther ; le débit est réglé de manière à recueillir une goutte de liquide par seconde.

Nous faisons passer sur la colonne 25 cm³ d'une solution étherée de phosphatides contenant 3,3 mg. de phosphore et 3,95 mg. d'azote ; le rapport N|P est donc de 2,6. Nous recueillons ensemble le filtrat et l'éther de lavage de la colonne, 100 cm³ en tout.

Résultats -

La totalité du phosphore est retrouvée, mais l'azote n'est plus que de 3,27 mg. ; le rapport N|P n'est alors que de 2,2 au lieu de 2,6.

Dans une autre expérience, nous utilisons un mode opératoire légèrement modifié :

Mode opératoire -

50 cm³ de solution chloroformique de phosphatides contenant 17 mg. de phosphore et 23,5 mg. d'azote (rapport N|P de 3) sont concentrés et le résidu est desséché sous pression réduite dans un dessiccateur contenant de l'anhydride

phosphorique, jusqu'à poids constant, soit 768 mg. Le résidu est dissous dans 50 cm³ d'éther et la solution additionnée d'environ 8 g. de poudre de cellulose identique à celle utilisée dans l'expérience précédente. Après une agitation d'une dizaine de minutes, nous recueillons la solutions étherée par centrifugation ; la poudre est ensuite lavée deux fois par 10 cm³ d'éther. Les solutions étherées sont réunies et évaporées. Le résidu est desséché et pesé : soit 640 mg. ; les dosages d'azote et de phosphore effectués sur la solution chloroformique des phosphatides ainsi purifiés, montrent qu'ils renferment 17 mg. de phosphore et 14,15 mg. d'azote ; le rapport N|P n'est plus que de 1,8. Un deuxième traitement identique n'apporte aucune modification à ce chiffre.

Si nous faisons subir à cette dernière solution chloroformique, une défécation ferrique analogue à celle décrite précédemment, nous ne dosons que des traces d'azote hydrosoluble dans la solution aqueuse.

Conclusion -

Les phosphatides de la Patelle préparés par les précipitations acétoniques et les lavages habituellement recommandés possèdent un rapport N|P voisin de 3. Ce chiffre est anormalement élevé, puisque chez les autres espèces, chez les Mammifères en particulier, on trouve pour ce même rapport une valeur à peine supérieure à l'unité, l'écart étant dû à la sphingomyéline qui contient 2 N pour 1 P. Les acides aminés sont en partie responsables de ce rapport élevé ; il est possible de les éliminer plus ou moins complètement au moyen de la poudre de cellulose, ou d'une défécation ferrique.

Les phosphatides traités par la poudre de cellulose ont un rapport N|P voisin de 1,8 ; ce rapport est identique à celui calculé pour les phosphatides adsorbés par l'hydroxyde de fer. Ceci signifie qu'à ce stade, la purification est beaucoup plus laborieuse ou que les substances azotées en excès entrent dans la composition des phosphatides. La poudre de cellulose entraîne les acides aminés libres, mais elle est sans action lorsqu'il s'agit de polypeptides plus complexes ; ce sont peut-être ces composés qui surchargent les phosphatides.

4°. Phosphatides purifiés.

Nous nous proposons de rechercher si ces phosphatides, dont le rapport

N|P est voisin de 2, sont encore accompagnés d'acides aminés libres que la poudre de cellulose n'aurait pu éliminer ou de polypeptides que cette même poudre n'entraîne pas.

a) acides aminés libres

Afin de mettre en évidence la présence éventuelle d'acides aminés, nous faisons l'électrophorèse d'une émulsion de phosphatides dans les conditions décrites par BLASS (6).

Mode opératoire -

64 mg. de phosphatides purifiés sont émulsionnés dans 0,5 cm³ d'eau, par malaxage prolongé avec un gros agitateur de verre.

Cette émulsion est soumise à l'électrophorèse avec l'appareillage décrit dans le premier chapitre, mais avec un tampon alcalin à pH 8,6

- véronal sodique 10,3 g.
- véronal acide 1,84 g.
- eau, en quantité suffisante pour 1 litre.

Cette solution est utilisée après avoir été diluée 10 fois.

Le courant électrique passe pendant 3 heures, avec une intensité maximum de 15 μ A.

L'électrophorégramme est ensuite séché à l'air libre, et non à l'étuve, afin d'éviter le jaunissement du papier alcalin, puis traité par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,1 p. 100 dans le butanol.

Dans ces conditions, après un séjour de plusieurs minutes dans l'étuve à 60°, les acides aminés doivent apparaître sous forme de spots rose violacé.

Résultats -

Aucun spot ne se révèle ; les phosphatides ne sont donc pas accompagnés d'acides aminés libres.

b) polypeptides

Si les polypeptides sont responsables de la valeur anormale du rapport N|P, nous devons pouvoir les mettre en évidence, après hydrolyse des phosphatides.

Mode opératoire -

Nous hydrolysons les phosphatides purifiés suivant la technique

utilisée par LEVINE et CHARGAFF (58).

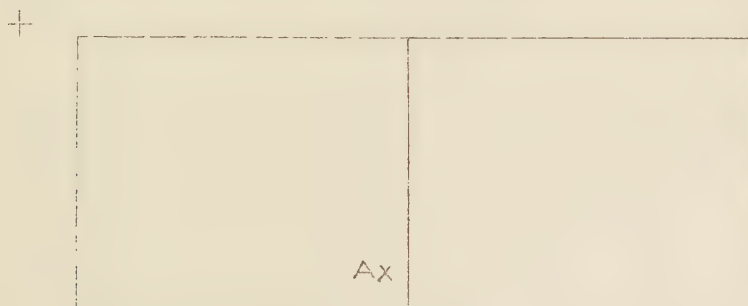
115 mg. de phosphatides sont hydrolysés pendant 30 heures par 10 cm³ d'acide chlorhydrique 6 N. Après refroidissement, la solution est filtrée, afin d'éliminer les acides gras. L'acide chlorhydrique est chassé au bain-marie bouillant, avec plusieurs reprises successives par l'eau. Le dernier résidu est dissous dans environ 5 cm³ d'eau et filtré sur amiante et sable de Fontainebleau.

Le filtrat et l'eau de lavage sont concentrés jusqu'à 0,5 cm³ ; c'est sur cette solution que nous recherchons les acides aminés résultant de l'hydrolyse des peptides supposés présents.

La chromatographie, appliquée seule aux acides aminés est insuffisante, car elle ne permet pas une bonne séparation de certains aminoacides ayant même R_F par exemple la sérine, le glycolle et l'acide aspartique (6) ; d'autre part, la colamine présente dans les phosphatides ne se distingue pas de la tyrosine.

Nous utilisons la méthode dite de "chromatoionophorèse", telle qu'elle est utilisée par BLASS (5). Nous opérons avec les appareils de chromatographie et d'électrophorèse précédemment décrits, en deux phases successives.

- chromatographie : elle est faite avec du papier Durieux n° 98, découpé en bande de 18 cm de large et 46 cm de long, partagée en deux parties égales par une ligne parallèle à la largeur. La solution à analyser est déposée à l'aide d'une micropipette en un point situé à 3 cm du bas de la feuille, à 2 cm à gauche de la ligne médiane, en A.



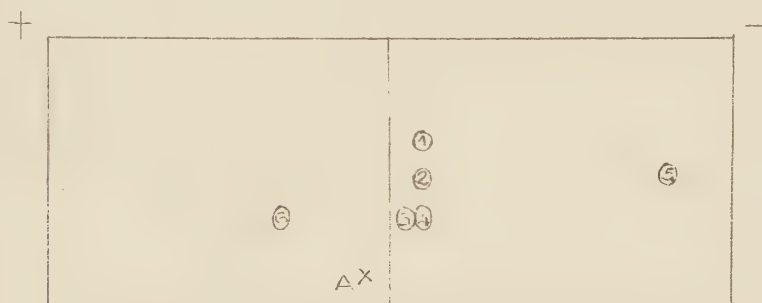
Nous utilisons la phase butanol-éthanol-acide acétique-eau (8-2-1-3) en technique ascendante, pendant 6 heures.

La feuille est séchée à l'étuve à 100°.

- électrophorèse : l'opération est faite dans les conditions décrites page 20 en milieu alcalin ; elle est suivie d'une révélation par la ninhydrine.

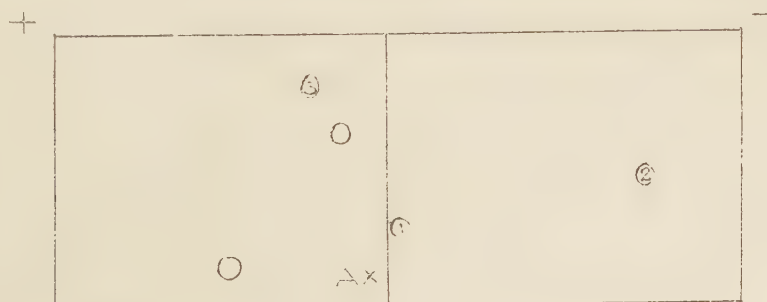
Résultats -

Nous vérifions au préalable que la technique donne des résultats satisfaisants avec un mélange d'acides aminés témoins ; ceci nous permet également de localiser l'emplacement des spots.



- Le spot n° 1 correspond à la tyrosine
- n° 2 correspond à l'alanine
- n° 3 correspond à la sérine
- n° 4 correspond au glycolle
- n° 5 correspond à la colamine
- n° 6 correspond à l'acide glutamique

Par chromatocionophorèse de l'hydrolysate de phosphatides purifiés, nous décelons la présence de plusieurs acides aminés et de la colamine.



Les spots 1 et 2 sont respectivement ceux de la sérine et de la colamine, qui indiquent la présence de phosphatidylsérine et de céphaline à côté de la léci-thine. Le spot 3 n'est pas celui de la tyrosine ; la réaction de Millon faite sur une fraction de l'hydrolysat étant négative. Les autres spots sont ceux d'acides aminés que nous n'avons pas encore identifiés jusqu'à présent.

Conclusion -

Les phosphatides de la Patelle possèdent donc des propriétés et des caractéristiques différentes de celles des phosphatides animaux.

- bruts, ils ont rapport N|P voisin de 3 que des précipitations acéto-niques successives ne diminuent pas, mais semblent au contraire augmenter.

- LE BRETON (56) dès 1921, signale que la totalité du phosphore des phosphatides n'est pas de nature lipidique ; chez la Patelle, les phosphatides ne contiennent qu'une seule forme de phosphore. Le taux de phosphore est anormalement faible, mais la composition des phosphatides n'est peut-être pas seule en cause ; ainsi dans la dernière expérience, le pourcentage du phosphore des phosphatides purifiés atteint 2,6 % ; il n'est donc pas normal puisque le chiffre habituel est voisin de 4 %. Une purification supplémentaire est peut-être susceptible de l'augmenter encore.

- ils sont accompagnés de substances azotées non lipidiques, non entraî-nables par lavage avec des solutions salines ; ce sont des acides aminés, suscep-tibles d'être éliminés par un traitement à la poudre de cellulose ; après cette purification, les phosphatides ont un rapport N|P voisin de 2. L'état actuel de nos recherches ne nous permet pas de conclure à la présence de diaminophosphatides, car cette valeur peut être due à des polypeptides que la poudre de cellulose n'en-traîne pas.

Après hydrolyse chlorhydrique, nous obtenons effectivement par chromato-ionophorèse, en dehors des spots de colamine et de sérine, ceux d'acides aminés que nous n'avons pas identifiés jusqu'ici.

Nous ne pouvons conclure si ces peptides, dont l'existence est révélée par les acides aminés après hydrolyse, sont des impuretés ou s'ils entrent dans la constitution des phosphatides. Nous avons en outre mis en évidence la présence de phosphatidylsérine et de céphaline, mais nous n'avons pas défini dans quelles

proportions ils entrent dans la composition des phosphatides. L'étude des phosphatides de la Patelle n'est donc pas terminée et ce chapitre est en fait le début d'un travail sur leur composition que nous nous proposons de poursuivre.

QUATRIEME CHAPITRE
VARIATIONS SAISONNIERES DES SUBSTANCES CHOLINIQUES

Au cours de notre travail d'identification de la choline hydrosoluble combinée nous avons été amenés à faire de nombreuses préparations à partir de divers lots de Patelles. Nous avons ainsi observé que le taux de la choline de l'extrait varie dans de larges limites. Cela se traduit, dans les cas favorables, non seulement par un taux si faible que l'extrait ne convient pas pour les essais d'identification, mais par un rapport $N|CHC$ si élevé qu'il rend les purifications très laborieuses ou même impossibles. En effet, l'abaissement du taux de la choline ne s'accompagne pas d'un abaissement parallèle du taux de l'azote de l'extrait, qui reste compris dans tous les cas examinés entre 2 et 3 mg. par g. d'animal sans coquille. Pour le rapport $N|CHC$ (défini comme étant le rapport du nombre d'atomes d'azote au nombre de molécules de choline hydrosoluble combinée) nous trouvons par contre les valeurs extrêmes 14 et 115. Le taux de la glycérylphosphorylcholine n'est donc pas constant et le chiffre de 2 mg. par g. (en ion choline) trouvé par KAHANE et LEVY (48) subit des variations que nous nous proposons d'étudier.

I. ETUDE DES VARIATIONS DE LA GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE.

1°. Techniques.

Nous dosons l'azote, le phosphore et la choline par les méthodes décrites et utilisées dans le premier chapitre.

2°. Le taux de la glycérylphosphorylcholine n'est pas constant.

Les premières expériences faites au printemps montrent que la Patelle ne contient que 2,45 mg. par gramme de glycérylphosphorylcholine, c'est-à-dire la moitié de ce qu'avaient dosé KAHANE et LEVY au mois d'août 1938. En été, nous n'observons aucune modification du taux de glycérylphosphorylcholine mais celui-ci diminue en automne à 1,23 mg. pour être voisin de 0,45 mg. pendant les mois d'hiver. Le taux de glycérylphosphorylcholine n'est donc pas constant au cours de l'année.

Nous nous proposons d'étudier en détail ce phénomène afin d'observer si ces variations sont anarchiques ou au contraire si elles sont régulières et reproductibles.

5°. Le taux de glycérylphosphorylcholine subit des variations saisonnières.

Les techniques utilisées ne sont pas responsables des quantités variables de glycérylphosphorylcholine que nous dosons ; nous avons précédemment montré (p. 57) que les conditions de préparation de l'extrait aqueux déféqué éliminent tout risque de dégradation autolytique et qu'elles permettent d'obtenir des résultats reproductibles.

a) Patelles de Roscoff (1)

Mode opératoire -

Pour étudier les variations du taux de glycérylphosphorylcholine, nous analysons des Patelles, une fois par mois, pendant toute une année. Ce sont des animaux récoltés à Roscoff, conservés et expédiés dans des algues humides, que nous recevons vivants après 24 heures de transport. A chaque expérience, nous traitons une douzaine d'animaux, comme nous l'avons précédemment décrit ; c'est sur des prises aliquotes de la solution déféquée et concentrée que nous dosons la choline, l'azote et le phosphore.

Résultats -

Les valeurs du tableau XX sont indiquées en mg. de glycérylphosphorylcholine par gramme d'animal sans coquille.

Nous désignons par : GPC, la glycérylphosphorylcholine,

N|GPC, le rapport de l'azote total à l'azote de la glycérylphosphorylcholine,

P|GPC, le rapport du phosphore total au phosphore de la glycérylphosphorylcholine.

(1) Nous remercions Monsieur le Professeur TEISSIER, Directeur de la Station zoologique de Roscoff, de nous avoir permis de travailler quelque temps dans son laboratoire, ainsi que Monsieur le Professeur DRACH qui nous a donné de précieux conseils. Nous remercions également Monsieur LEVI, Chef de Travaux de la Station, qui nous a expédié les Patelles pendant plusieurs années|

XX.- VARIATIONS, en 1952, DE LA GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE DANS
LA PATELLE DE ROSCOFF -

Dates	en mg. par g.			P GPC	N GPC
	GPC	P	N		
30 . 1 . 52	0,47	0,06	2,04	11	114
22 . 2 . 52	0,50	0,10	3,25	1,20	76
6 . 5 . 52	1,70	0,25	2,30	1,04	24
18 . 6 . 52	2,27	0,34	2,02	1,25	14
11 . 9 . 52	2,96	0,38	3,08	0,38	19
23 . 10 . 52	1,30	0,16	1,69	0,95	26
13 . 1 . 53	0,45	0,05	1,85	0,90	76

Ce tableau montre :

1°- que le taux de la glycérylphosphorylcholine n'est pas constant au cours de l'année, mais qu'il subit des variations saisonnières ; il est minimum en hiver (0,45 mg. par g.) et croît pendant le printemps pour être maximum en été (2,96 mg. par g.) ; il décroît très rapidement en automne.

2°- que le rapport P|GPC est toujours voisin de l'unité, ce qui confirme que la glycérylphosphorylcholine est tout au long de l'année le seul constituant phosphoré de nos extraits.

3°- que le taux d'azote est sensiblement constant et compris entre 2 et 3 mg. par g. (courbe 1).

Nous observons en outre que le cycle annuel est reproductible et que les minima et les maxima sont sensiblement les mêmes d'une année sur l'autre (tableau XXI).

XXI.- VARIATIONS ANNUELLES DU TAUX DE LA GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE
DANS LA PATELLE DE ROSCOFF (1953 et 1954)

Année 1953	GPC en mg/g	Année 1954	GPC en mg/g
15 . 1	0,44	19 . 1	0,34
28 . 2	0,40	23 . 2	0,50
9 . 3	1,16		
8 . 4	1,60	1 . 4	0,90
1 . 5	1,82	4 . 5	2,07
10 . 6	2,76	9 . 6	2,96
7 . 7	2,25	13 . 7	2,70
2 . 9	4,40	10 . 9	4,07
7 . 10	1,95		
16 . 11	0,29		
16 . 12	0,24		

Le minimum est toujours voisin de 0,45 mg. par g. mais le maximum varie puisque, de 2,96 mg. en 1952, il passe à 4,44 en 1953 et 4,06 en 1954. L'allure du cycle est la même ; nous notons un chiffre anormal en avril 1953, où le taux de glycérylphosphorylcholine est voisin de 3 mg.

Nous tenterons d'expliquer plus tard ce chiffre anormalement élevé.

b) animaux d'origine différente

Ce phénomène saisonnier est-il particulier aux animaux de Roscoff ou touche-t-il des Patelles récoltées en d'autres lieux ?

Nous analysons successivement des animaux de Plymouth, de l'île de Ré et d'Endoume à des moments différents de l'année, correspondants aux changements de saison, de manière à mettre en évidence un cycle éventuel.

Résultats - (tableau XXII).

- Patelles de Plymouth :

Il y a également un cycle annuel du taux de glycérylphosphorylcholine, avec minimum en hiver et maximum en été, mais la période de croissance est plus tardive, puisqu'en juin, il n'y a pas eu augmentation sensible ; le maximum ,

aussi élevé que chez les Patelles de Roscoff, se situe à la fin de l'été.

- Patelles de l'Ile de Ré (*Patella vulgata*)

Le cycle est identique à celui que nous mettons en évidence dans les Patelles de Roscoff ; les valeurs minima et maxima sont du même ordre de grandeur et situées à des périodes semblables de l'année.

- Patelles d'Endoume (*Patella lusitana* et *coerulea*)

Chez ces animaux de la côte Méditerranéenne, de petite taille et récoltés dans la vase, il y a également un cycle saisonnier avec minimum en hiver, et maximum en été.

XXII.- VARIATIONS ANNUELLES DU TAUX DE GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE
DANS DES PATELLES DE DIFFERENTES REGIONS -

M o i s	GPC exprimée en mg/g.		
	Plymouth	Ile de Ré	Endoume
Janvier	0,24		
Février			0,21
Mars			1,46
Avril	0,40	0,80	
Juin	1,18		
Juillet	3,45	4,70	2,00
Septembre	4,70	2,23	0,99
Décembre		0,38	

c) Gastéropodes voisins

La Patelle n'est peut-être pas le seul Gastéropode marin dont le taux de glycérylphosphorylcholine subit des variations saisonnières et nous examinons quelques espèces voisines.

Nous remercions le laboratoire de Plymouth et le Bureau Scientifique de l'Ambassade de France à Londres, pour les envois de Patelles. Nous remercions également Madame D. SCHACHTER et Monsieur P. DESCHAMPS, chargés de recherches au C.N.R.S., qui nous ont expédié des Patelles d'Endoume et de l'Ile de Ré.

- *Littorina littorea*
- *Gibbula obliquata*
- *Littorina obtusata*
- *Monodonta lineata*

Le tableau III montre :

1°) que ces animaux sont pauvres en choline hydrosoluble combinée puisqu'ils n'en contiennent que 0,16 à 0,83 mg. par g. (exprimé en glycérylphosphorylcholine).

2°) que ce taux est constant toute l'année, ou tout au moins qu'il ne présente pas de variations significatives, sauf chez *Littorina obtusata* où la valeur la plus élevée est trouvée l'hiver, ce qui est en désaccord avec ce que nous observons chez la Patelle.

XXIII.- TAUX DE GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE DANS QUATRE GASTEROPODES
VOISINS DE LA PATELLE --

Echantillons	Dates	GPC en mg/g
<i>Littorina littorea</i>	23.2.54	0,16
	9.6.54	0,44
	5.9.54	0,31
<i>Gibbula obliquata</i>	23.2.54	0,29
	9.6.54	0,49
	5.9.54	0,30
<i>Littorina obtusata</i>	23.2.54	0,83
	9.6.54	
	5.9.54	0,13
<i>Monodonta lineata</i>	23.2.54	0,24
	9.6.54	0,30
	5.9.54	0,49

Conclusions.-

Nous mettons en évidence dans les Patelles de Roscoff, de Plymouth de l'Ile de Ré et d'Endoume, un cycle annuel de la glycérylphosphorylcholine avec minimum en hiver et maximum en été ; les périodes de croissance et de décroissance

se situent respectivement au printemps et à l'automne. D'autres Gastéropodes beaucoup plus pauvres que la Patelle en glycérylphosphorylcholine semblent ne pas présenter ce phénomène, à l'exception peut-être de *Littorina obtusata*, chez lequel la plus haute teneur en glycérylphosphorylcholine est dosée l'hiver.

4°. Localisation du phénomène.

Nous nous sommes proposés de vérifier si les variations saisonnières de la glycérylphosphorylcholine intéressaient l'animal entier, ou si en réalité certains tissus ne présenteraient pas une teneur constante tandis que pour d'autres les teneurs varieraient dans de grandes limites.

Mode opératoire -

Pour un lot de Patelles donné, nous dosons la glycérylphosphorylcholine de l'animal entier, du muscle et des viscères que nous séparons soigneusement après avoir enlevé les coquilles. Notons que le muscle représente à lui seul 60% du poids de l'animal entier sans coquille.

Résultats - (tableau XXIV).

XXIV.- VARIATIONS ANNUELLES DU TAUX DE GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE DANS LA PATELLE DE ROSCOFF, LES VISCERES ET LE MUSCLE

I a t e s	GPC exprimé en mg. par g.		
	Animal entier	Muscle	Viscères
28. 1.53	0,41		0,44
9. 3.53	1,16		0,79
15. 5.53	1,84		0,69
10. 6.53	2,50	4,10	0,70
7. 7.53	3,10	4,10	0,54
2. 9.53	4,40	7,30	0,63
7.10.53	1,07	1,92	0,39
18.11.53	0,31	0,22	0,32
16.12.53	0,24	0,34	0,23
19. 1.54	0,34	0,36	0,32
23. 2.54	0,50	0,54	0,49
1. 4.54	0,90	1,40	0,39
3. 5.54	2,10	2,50	0,37
9. 6.54	2,96	4,20	0,54
13. 7.54	3,76	6,30	0,39
15. 9.54	4,00	4,30	0,58

Ce tableau montre :

1°) que dans les viscères le taux de glycérylphosphorylcholine est en moyenne de 0,49 mg. par g. et que les variations n'affectent pas l'allure de cycle annuel.

2°) que seule la glycérylphosphorylcholine du muscle subit des variations saisonnières; l'amplitude du cycle est très grande : le taux minimum de 0,22 mg. l'hiver peut atteindre 7,3 mg. en été, soit 33 fois plus élevé.

II. ETUDE DES FACTEURS EXTERNES.

Au préalable, nous devons noter qu'il ne nous est pas possible de faire des expériences en laboratoire, parce que l'élevage de la Patelle est difficile à réaliser hors de son milieu naturel. Les conditions de vie de cet animal sont influencées par différents agents extérieurs dont le plus important est la marée, phénomène difficilement reproductible. En outre interviennent des facteurs variés tels que la température de l'eau et de l'air, l'agitation de l'eau, la richesse du milieu en matières organiques, les lieux de fixation, la salinité du milieu qui créent des conditions peu accessibles à l'expérience.

Nous avons étudié différents facteurs susceptibles d'avoir une influence sur le métabolisme de la Patelle, donc sur la glycérylphosphorylcholine.

1°. Les conditions de récolte et de transport.

Au cours d'un séjour à Roscoff, nous examinons des Patelles récoltées et conservées dans des conditions aussi variées que possible, afin d'observer si ces conditions peuvent avoir une influence sur la teneur en glycérylphosphorylcholine. Les résultats des différentes expériences sont réunis dans le tableau XXV.

Il montre que le taux de glycérylphosphorylcholine subit de faibles variations et qu'il s'écarte peu de la valeur moyenne, que la cueillette soit faite avant ou après immersion, sur des rochers couverts d'Algues ou de Cirripèdes. Les écarts observés chez les animaux conservés à sec, sous des Algues, dans l'eau de mer à 9° ou à 2° sont également faibles. Le transport dans les Algues pendant 24 heures est sans influence. Nous ne relevons donc aucune variation significative.

XXV.- INFLUENCE DES CONDITIONS DE RECOLTE ET DE CONSERVATION
SUR LE TAUX DE GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE -

	GPC en mg. par g.
<u>Conditions de récolte</u>	
- avant immersion	1,10
- après immersion	0,80
- sur des rochers à Fucacées	0,99
- sur des rochers couverts de Cirripèdes	1,22
<u>Conditions de conservation</u>	
6 jours au laboratoire :	
- sous des algues (+ 10°)	1,22
- sur du ciment (+ 10°)	1,10
- dans l'eau de mer courante (+ 9°)	0,99
- dans l'eau de mer à + 2°	0,94
<u>Conditions de transport</u>	
- dans des algues pendant 24 heures	1,20
Moyenne	1,06

2°. La Sexualité.

BRADLEY (11) observe que chez les Mollusques dont la période d'activité sexuelle est située en été, il y a augmentation des glucides et que cette augmentation se poursuit jusqu'au début de l'hibernation.

Dans le cas de la Patelle, la sexualité ne semble jouer aucun rôle dans les variations du taux de glycérylphosphorylcholine. Chez cet animal, il est aisé de distinguer les éléments mâles des femelles (70). Les glandes sexuelles mâles sont blanc crémeux ; examiné au microscope, un petit fragment permet d'apercevoir les spermatozoïdes ; les glandes femelles brunes ou vert olive ne montrent au microscope que des ovules globuleux.

Nous avons analysé séparément les animaux mâles et les animaux femelles (tableau XXVI).

XXVI.- LA GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE DANS LES ORGANES SEXUELS DE LA
PATELLE DE ROSCOFF -

Dates	Echantillons	GPC en mg g.
27 . 9 . 52	Animal entier	1,380
	Organe ♂	0,335
	Organe ♀	0,100
28 . 1 . 53	Animal entier	0,420
	Organe ♂	0,245
	Organe ♀	0,095

Cette expérience montre que les organes sexuels sont pauvres en glycérilphosphorylcholine et que le taux subit de faibles variations.

Ceci n'est pas en faveur de l'hypothèse du rôle éventuel que pourrait jouer la sexualité. En outre, les périodes de maturité sexuelle et de reproduction sont variables.

ORTON (70, 71) qui a étudié les phénomènes de reproduction chez la Patelle, émet l'hypothèse d'un changement de sexe pendant la vie de l'animal et admet l'existence d'éléments hermaphrodites. Par ailleurs, FISHER-PIETTE (29) a observé que suivant les régions, les périodes de maturité sexuelle sont différentes ; ainsi en Bretagne, les animaux sont aptes à la reproduction d'Octobre à Janvier, tandis qu'en Ecosse, ils le sont de Juin à Décembre. Le cycle si régulier de la glycérilphosphorylcholine ne semble pas être en relation avec des phénomènes aussi anarchiques, sans rapport avec les saisons.

3°. L'âge des animaux.

L'âge des animaux ne peut être apprécié par la grandeur de la coquille ou le nombre de ses stries d'accroissement, car la croissance de la Patelle est fonction du milieu : plus le milieu est riche en matières organiques, plus la croissance est rapide (28).

Nous observons que le taux de glycérilphosphorylcholine varie peu , quelles que soient les dimensions de la coquille, pour un même lot (tableau XXVII) (Janvier 1953).

XXVII.- INFLUENCE DE LA TAILLE SUR LE TAUX DE GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE

Poids individuels en g.	Longueur moyenne grand axe en mm.	Nombre d'animaux analysés	GPC en mg. g.
68	47	10	0,44
63,5	42	15	0,40
33,5	29	25	0,50
moyenne			0,41

4°. L'alimentation.

FISCHER (30) note que pendant la saison froide, il y a diminution ou même arrêt de l'alimentation chez les Gastéropodes marins ou d'eau douce. Les Patelles ingèrent indifféremment des Diatomées, des Algues, des Acariens et cette diversité de nourriture doit leur assurer une subsistance régulière. Nous ne pouvons malheureusement faire que des hypothèses quant au rôle joué par l'alimentation; comme nous l'avons déjà signalé l'expérimentation nous est peu accessible. En outre, pour étudier l'influence du facteur alimentaire, il faut faire vivre l'animal hors de son milieu naturel et il est difficile de faire varier isolément un seul facteur.

5°. La température.

La température joue probablement un rôle important, mais il est difficile d'étudier son action.

Lorsqu'il s'agit d'animaux pour qui l'eau est le seul milieu de vie, l'influence de la température de l'eau de mer est sans doute décisive. C'est ainsi que RONOLD (75) met en évidence chez différents poissons une variation annuelle du taux d'oxyde de triméthylamine avec minimum en été, qui semble en relation avec la température; mais chez la Patelle, le problème est différent, puisque c'est un animal qui se fixe sur les rochers des plus hauts niveaux et passe donc la plus grande partie de sa vie hors de l'eau.

La seule tentative que nous ayons faite n'a pas donné de résultats satisfaisants.

Mode opératoire -

Le 27 Avril 1955, un lot de Patelles est récolté dans les conditions habituelles, c'est-à-dire sur les rochers de la plage, à marée basse, à Roscoff. Une partie de ces animaux nous sont expédiés immédiatement, et nous y dosons la glycérylphosphorylcholine dès leur arrivée, après le traitement habituel par le sulfate ferrique (voir page 6).

Les autres animaux de cette récolte sont conservés à Roscoff pendant quinze jours dans un bac où circule l'eau de mer maintenue à 13-14° par un système de chauffage ; cette température est supérieure de 2-3° à celle de l'eau de mer normale. Le bac est garni de morceaux de rochers recouverts de microorganismes. Le 12 Mai l'expérience est interrompue et les animaux nous sont expédiés en même temps qu'un lot de Patelles récolté ce même jour (température de l'eau de mer voisine de 11°). Ce dernier lot est destiné à mettre en évidence une augmentation éventuelle de la glycérylphosphorylcholine survenue pendant les quinze jours de l'expérience. Nous comparons les teneurs en glycérylphosphorylcholine des Patelles :

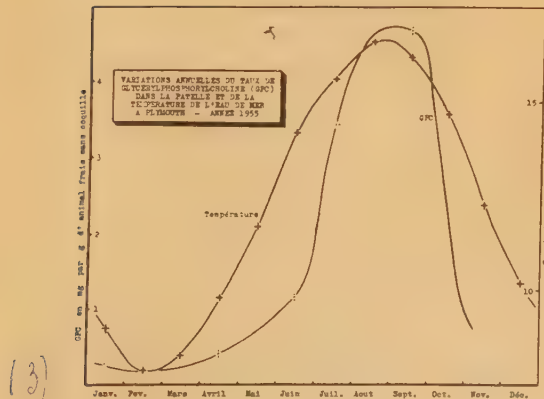
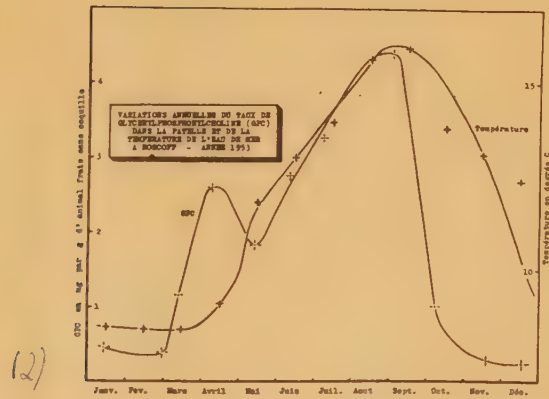
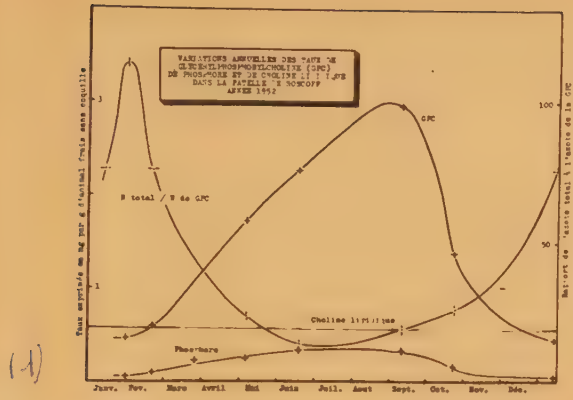
- du lot témoin, récolté le 27 Avril
- du lot soumis à l'expérience du 27 Avril au 12 Mai
- du lot témoin, récolté le 12 Mai (1).

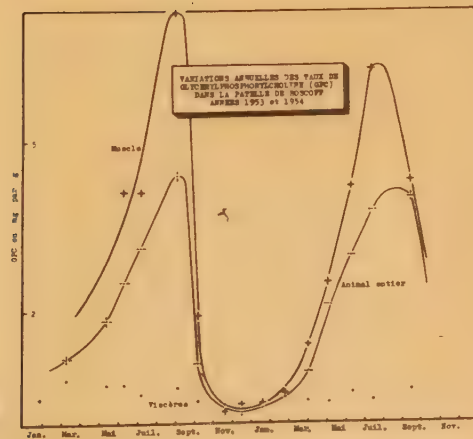
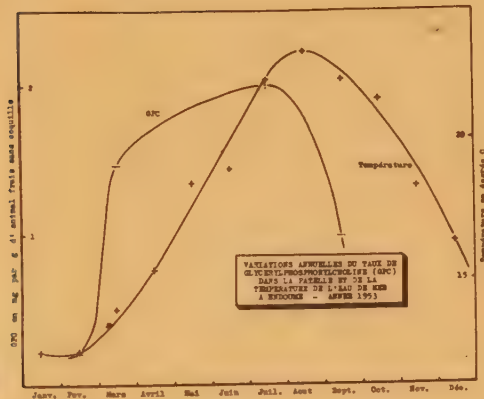
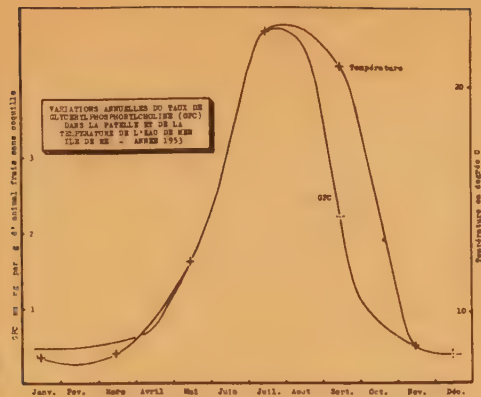
Résultats - (tableau XXVIII).

XXVIII.- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LE TAUX DE GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE

Conditions de l'expérience	G P C en mg. g.
- lot témoin du 27 avril	1,70
- lot soumis à l'expérience du 27 avril au 12 mai	1,54
- lot témoin du 12 mai	1,80

(1) Nous remercions Monsieur G. Deroux, assistant à la station zoologique de Roscoff, qui a mené à bien cette expérience.





Nous observons que les Patelles récoltées le 27 Avril et le 12 Mai, ont sensiblement la même teneur en glycérylphosphorylcholine : 1,75 mg|g. en moyenne. Les animaux soumis à l'expérience ont une teneur inférieure : 1,54 mg|g. Ce résultat, opposé à celui que nous attendions, peut s'expliquer, non par l'augmentation de la température qui est assez faible, 2 à 3°, mais par le fait que les Patelles ont été soumises à des conditions de vie inhabituelles, responsables de la mortalité observée, voisine de 70%|o. En effet, ces animaux sont restés immergés en permanence et n'ont pas eu l'alternance d'immersion et d'émersion qui leur est nécessaire ; en outre, ils ont jeûné. Cette diminution de la glycérylphosphorylcholine traduit donc un déséquilibre biologique et est certainement sans rapport avec l'augmentation expérimentale de la température. Cette tentative montre qu'il est impossible de vérifier d'une manière directe l'hypothèse du rôle de la température, sans effectuer au préalable une sérieuse étude biologique de la survie de la Patelle en aquarium. A défaut d'expérimentation, nous devons, pour le moment, nous contenter d'observation. Dans ce but, nous avons réuni les variations annuelles des températures de l'eau de mer à Roscoff, de Plymouth, de l'île de Ré et d'Endoume.

Les figures (2, 3, 4, 5) montrent que si les courbes des variations ont une allure identique à celles des variations de la glycérylphosphorylcholine, la chute de celle-ci précède celle de la température de l'eau de mer. Ce phénomène prouverait donc que la température de l'eau de mer n'a qu'un rôle secondaire et que c'est la température de l'atmosphère qui en définitive est déterminante.

Ce que nous observons en Avril 1953, est en accord avec cette hypothèse. A ce début de printemps, nous dosons dans l'animal entier 2,47 mg. de glycérylphosphorylcholine par g., valeur exceptionnellement élevée pour cette saison. Ceci s'explique peut-être par le fait que cette année là, le mois de mars a été particulièrement chaud ; la température anormalement élevée aurait eu une influence sur le métabolisme de la Patelle et expliquerait cette pointe du taux de glycérylphosphorylcholine. Notons que la température de l'eau de mer n'a pas subi cette hausse de température.

III. ETUDE DES FACTEURS INTERNES.-

Nous cherchons à mettre en évidence dans les tissus de la Patelle, des

corrélations susceptibles sinon d'expliquer, du moins d'éclaircir le mécanisme du phénomène. Dans ce but, nous étudions successivement les variations annuelles du taux de la choline non hydrosoluble et de la bétaine.

1°. La choline non hydrosoluble.

Si nous admettons que la glycérylphosphorylcholine joue un rôle important soit dans la synthèse, soit dans la dégradation des phosphoaminolipides, son métabolisme doit être intimement lié à celui des lipides. Nous nous sommes proposés de rechercher si le cycle de la glycérylphosphorylcholine n'est pas dû à des modifications de la teneur en lécithine des tissus ; à certaines périodes la glycérylphosphorylcholine serait sous forme libre, tandis qu'à d'autres, elle serait estérifiée par les acides gras. S'il en était ainsi, la teneur en choline lipidique serait variable et subirait un cycle analogue à celui de la glycérylphosphorylcholine, mais avec un minimum en été et un maximum en hiver. Nous tentons de vérifier cette hypothèse.

Dans le troisième chapitre, nous avons noté que l'état actuel de nos recherches ne nous permettait pas d'affirmer que la totalité de la choline non hydrosoluble est lipidique ; cependant, dans l'hypothèse où la choline lipidique jouerait un rôle dans les variations de la glycérylphosphorylcholine, le taux de choline non hydrosoluble subissant la répercussion du phénomène, présenterait lui-même un cycle. Nous nous proposons donc de rechercher si cette choline non hydrosoluble subit des variations annuelles. Les variations de glycérylphosphorylcholine que nous cherchons à interpréter sont en effet d'un ordre de grandeur vis-à-vis duquel l'éventuelle différence entre choline non hydrosoluble et choline lipidique est tout à fait négligeable.

a) dosage de la choline non hydrosoluble

La Patelle contient de la choline sous forme libre (des traces), hydrosoluble et non hydrosoluble. L'ensemble de ces différentes formes constitue la choline totale. Nous calculons la choline non hydrosoluble par différence (choline totale - choline hydrosoluble totale) en utilisant la technique décrite dans le chapitre sur l'étude des lipides.

b) étude des variations de la choline non hydrosoluble

- Patelles de Roscoff

. animal entier

Nous étudions les variations de la choline non hydrosoluble deux années consécutives, afin de mettre en évidence la reproductibilité du phénomène (tableau XXIX).

XXIX.- VARIATIONS ANNUELLES DU TAUX DE CHOLINE NON HYDROSOLUBLE
DE LA PATELLE DE ROSCOFF -

M o i s	Choline non hydrosoluble en mg g	
	Année 1953	Année 1954
Janvier	0,59	0,52
Février	0,52	0,55
Mars	0,54	0,66
Avril	0,52	
Mai	0,58	0,50
Juin	0,51	0,54
Juillet	0,60	0,65
Septembre	0,54	0,60
Octobre	0,60	
Novembre	0,66	
Décembre	0,52	

Le taux est constant au cours de l'année et compris entre 0,50 et 0,60 mg par g. d'animal.

. muscle et viscères

Nous analysons séparément les viscères et le muscle de l'animal, comme nous l'avons déjà fait pour l'étude des variations du taux de glycérylphosphorylcholine.

Le taux de choline non hydrosoluble des viscères (tableau XXX) n'est pas constant pendant l'année, mais comme nous l'avons déjà observé pour la glycérylphosphorylcholine, ces variations ne sont pas saisonnières.

XXX.- VARIATIONS ANNUELLES DE LA CHOLINE NON HYDROSOLUBLE DES
VISCERES DE LA PATELLE DE ROSCOFF

M o i s	Choline non hydrosoluble en mg./g.	
	Année 1953	Année 1954
Janvier		0,88
Février	0,67	0,46
Mars	0,51	0,52
Avril		
Mai	0,53	0,68
Juin		0,66
Juillet	0,59	0,68
Septembre	0,40	0,61
Octobre	0,61	
Novembre	0,71	
Décembre	0,89	

Le muscle (tableau XXXI), au contraire, a un taux de choline non hydrosoluble variable au cours de l'année. Le minimum voisin de 0,30 mg. en hiver, croît au printemps et atteint son maximum en été avec 0,80 mg. ; il décroît dès l'automne. Mais l'amplitude des variations est faible et ne peut se comparer à celle de la glycérylphosphorylcholine.

Les variations sont donc dans le même sens que celles de la glycérylphosphorylcholine, mais leur amplitude est beaucoup plus faible. Il n'est pas exclus qu'il y ait un lien entre les deux phénomènes.

XXXI.- VARIATIONS ANNUELLES DE LA CHOLINE NON HYDROSOLUBLE DANS
LE MUSCLE DE LA PATELLE DE ROSCOFF -

M o i s	Choline non hydrosoluble en mg/g.	
	Année 1953	Année 1954
Janvier		0,33
Février		0,44
Mars		
Avril		0,77
Mai		0,86
Juin	0,78	0,81
Juillet	0,74	0,60
Septembre	0,56	0,72
Octobre	0,67	
Novembre	0,58	
Décembre	0,28	

- Patelles d'origines différentes

Nous réunissons dans le tableau XXXII les taux de choline non hydrosoluble des Patelles de Plymouth, Ile de Ré et Endoume.

A l'exception des animaux d'Endoume chez lesquels les valeurs de choline non hydrosoluble sont assez anarchiques, il semble y avoir un cycle annuel de la choline non hydrosoluble chez les autres Patelles, mais l'amplitude des variations n'est pas comparable à celle de la glycérylphosphorylcholine.

Conclusion -

Dans les viscères, nous n'observons pas de variations saisonnières du taux de la choline non hydrosoluble, mais dans le muscle, voisin de 0,3 mg. par g. en hiver, il est presque trois fois supérieur en été. Cette variation moins accusée que celle de la glycérylphosphorylcholine semble indiquer une relation possible entre cet ester et la choline non hydrosoluble et par suite avec les phosphatidylcholines.

XXXII.- VARIATIONS ANNUELLES DE LA CHOLINE NON HYDROSOLUBLE
DANS LES PATELLES DE DIFFERENTES REGIONS -

M o i s	Choline non hydrosoluble en mg g.		
	Plymouth	Ile de Ré	Endoume
Janvier	0,40		
Février			0,51
Mars			0,93
Avril	0,36	0,54	
Juin	0,51		
Juillet	1,19	0,64	0,51
Septembre	0,94	0,76	0,80
Novembre			0,91
Décembre		0,15	

2°. La bétaine.

Nous avons montré que les tissus de la Patelle contiennent une quantité considérable de bétaine, voisine de 6 mg. par g. Cette base peut participer au métabolisme de la Patelle, en relation avec la glycérylphosphorylcholine par des réactions secondaires de réduction en choline ou oxydation de celle-ci en bétaine. Si cette hypothèse est exacte, il se peut que la bétaine subisse également des variations saisonnières. C'est ce que nous tentons de mettre en évidence.

Mode opératoire -

Nous dosons la bétaine par pesée du reineckate (voir chapitre deuxième) isolé des extraits aqueux déféqués préparés au cours de l'année.

Résultats -

Nous remarquons (tableau XXXIII) que le taux de bétaine chez l'animal entier est constant pendant toute l'année et qu'il en est de même dans le muscle où les variations sont cependant plus grandes.

La bétaine ne joue donc aucun rôle à cet égard.

XXXIII.- CONSTANCE DU TAUX DE LA BÉTAÏNE DANS LA PATELLE DE ROSCOFF
ET DANS LE MUSCLE AU COURS DE L'ANNEE -

M o i s	Bétau'ne en mg g.	
	Animal entier	Muscle
Janvier	5,6	5,1
Février	4,2	4
Avril	5,2	4,2
Mai	5	5,6
Juin	5,6	
Juillet	6,1	
Septembre	5	
Octobre	5,8	5,2
Novembre	6,2	5,1
Décembre	5	4,6

Conclusion -

Nous observons que la glycérylphosphorylcholine des tissus de la Patelle, et notamment du muscle, subit un cycle annuel qui ne semble pas se produire chez d'autres Gastéropodes.

Ni la sexualité, ni la croissance ne semblent jouer un rôle ; la nourriture et les variations de la température ont peut-être une influence, mais nous n'avons pu réaliser d'expériences correctes dans lesquelles nous aurions pu observer l'influence directe de l'un ou de l'autre de ces deux facteurs.

Nous montrons qu'il n'y a aucun parallélisme entre les variations de la teneur en glycérylphosphorylcholine et en phosphoaminolipides ; la bétau'ne ne semble jouer aucun rôle dans le cycle.

CONCLUSIONS

I. LA GLYCERYLPHOSPHORYLCHOLINE DE LA PATELLE.

Nous identifions à la glycérylphosphorylcholine le composé trouvé en abondance dans la Patelle par E. KAHANE et J. LEVY et nommé "choline hydrosoluble combinée" par ces auteurs.

1) Nous montrons que ce composé est bien un ester de la choline : la base libérée par hydrolyse acide de l'extrait aqueux déféqué de l'animal donne quantitativement de la triméthylamine, par oxydation manganique en milieu alcalin et fournit un phosphotungstate dont les caractères analytiques coïncident avec ceux du phosphotungstate de choline.

En outre, sa solution aqueuse se comporte comme une solution de chlorure de choline synthétique, par chromatographie et par électrophorèse.

2) Après avoir purifié la choline hydrosoluble combinée de l'extrait aqueux déféqué, par adsorption sur colonne d'actigel et élution à l'eau chaude, nous obtenons une solution dont le rapport N/CHC est voisin de 2 et celui P/CHC égal à l'unité.

Par chromatographie en phase acide ascendante et électrophorèse sur papier avec un tampon à pH 2,5, cette solution purifiée donne des spots qui coïncident avec ceux de la glycérylphosphorylcholine témoin.

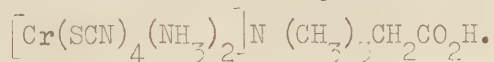
II. LA BETAINE DE LA PATELLE.

Au cours de la préparation des extraits en vue de l'identification de la choline hydrosoluble combinée, nous observons que les liqueurs-mères de précipitation du reineckate de choline fournissent par acidification un abondant précipité, dépourvu de choline libre et de glycérylphosphorylcholine. Nous identifions la base ainsi isolée à la bétaine.

1) Après recristallisation dans l'eau chaude ou par précipitations successives, nous obtenons un reineckate dont la calcination laisse un résidu d'oxyde chromique voisin de 18%.

Le composé étudié est dépourvu de phosphore, n'est pas attaqué par le permanganate en milieu acide ou alcalin, mais libère de la triméthylamine par oxydation persulfurique.

Ce sont les propriétés de la bétaine, car le produit synthétique fournit un reineckate dont la calcination laisse également un résidu voisin de 18°|o, en désaccord avec la théorie qui est de 17,2°|o pour



2) Ayant transformé le reineckate en chlorure, nous tentons d'identifier la substance sous forme de phosphotungstate, mais nous constatons que ce sel est mal défini, sa composition variant avec les conditions de précipitation.

Le phosphotungstate de bétaine synthétique possède cette même propriété ; calciné, il laisse un résidu variable suivant qu'il a été obtenu à chaud ou à froid, ce qui explique les anomalies observées autrefois par E. et M. KAHANE. Il ne diffère donc pas à cet égard du phosphotungstate de la base isolée de la Patelle.

3) C'est sous forme d'iodure que nous identifions la bétaine.

A partir du periodure préparé en milieu chlorhydrique, nous obtenons, après départ de l'iode libre et après recristallisation du sel brut, un iodure dont le cation a la composition centésimale de la bétaine, et ne possède qu'un atome d'iode pour deux molécules de base : formule brute voisine de $\text{IC}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$. Il fond à 231°.

Nous vérifions que l'hémiiodure de bétaine synthétique préparé dans des conditions identiques et l'hémiiodure de la base de la Patelle ont sensiblement la même composition centésimale et que le mélange des deux sels fond à 231°.

4) Par chromatographie, la solution d'iodure de la base et celle préparée à partir du phosphotungstate ont le même comportement en phase acide ascendante qu'une solution de chlorhydrate de bétaine synthétique. Il en est de même par électrophorèse.

5) Ayant dosé la bétaine de la Patelle sous forme de periodure, d'après la technique de Reifer, nous observons qu'elle atteint un taux très élevé de 5 à 6 m

par g. d'animal, soit près de 20 mg. par g. de substance sèche, valeur très élevée voisine des plus élevées trouvées dans le règne végétal, mais jamais trouvée dans les tissus animaux. La bétaine est également répartie dans tous les organes de la Patelle : muscle, organes sexuels et autres viscères, où elle se trouve difficilement diffusible, puisqu'elle n'existe qu'à l'état de traces dans le jus obtenu par pression ou par exsudation des tissus dans les vapeurs d'éther, qui représente cependant 15% du poids frais de l'animal.

III. LES LIPIDES DE LA PATELLE.

1) Nous étudions les lipides totaux de l'animal entier, des viscères et du muscle, extraits par la méthode de BLOOR ou de KUMAGAWA, opération quantitative dans les deux cas.

Ces lipides représentent une part importante des tissus de la Patelle et notamment des viscères qui en contiennent 90 mg. par g. de tissus frais, alors que le muscle n'en contient que 12 mg.

Le cholestérol qui n'existe que sous forme libre, est particulièrement abondant dans les viscères : 4,10 mg. par g. ; le muscle et l'animal entier en renferment respectivement 1,10 mg. et 2,55 mg. par g.

Les acides gras, d'un poids moléculaire moyen voisin de 300 sont ainsi répartis : 43,5 mg. par g. de viscères, 4,4 mg. par g. de muscle et 15 mg. par g. d'animal entier.

Les différents extraits de lipides totaux analysés ont un rapport N|P élevé, compris entre 3 et 4.

2) Les phosphatides de l'extrait lipidique de la Patelle précipitent mal par l'acétone. Après avoir défini les conditions les plus favorables, nous obtenons des phosphatides dépourvus d'esters hydrosolubles de choline et de bétaine, mais qui ont un rapport N|P anormalement élevé et voisin de 3, alors que théoriquement il devrait être voisin de l'unité.

3) Nous observons par une réaction positive à la ninhydrine que cette valeur supérieure à la normale est due à la présence de substances à fonction amine primaire qui accompagnent les lipides, phénomène souvent observé, mais qui atteint

ici une intensité exceptionnelle. Nous les éliminons grâce à un traitement par la poudre de cellulose. Ces phosphatides purifiés, bien que débarrassés des aminoacides, possèdent encore un rapport N|P voisin de 2, à peine moins anormal que le précédent.

Après hydrolyse chlorhydrique, par chromatocionophorèse, nous mettons en évidence la sérine et la colamine (qui traduisent la présence de phosphatidylsérine et de céphaline) et des acides aminés que nous n'avons pas encore identifiés. L'état actuel de nos recherches ne nous permet pas de conclure si ces aminoacides sont des impuretés ou s'ils entrent dans la constitution des phosphatides.

Nous nous proposons de poursuivre cette étude des phosphatides, afin de pouvoir en donner leur composition et leurs propriétés.

IV. VARIATIONS SAISONNIERES.

1) Nous mettons en évidence des variations saisonnières du taux de glycérylphosphorylcholine de la Patelle, il est minimum en hiver où il n'est que de 0,24 mg. par g. ; il croît pendant le printemps et atteint son maximum en été où il est voisin de 4,45 mg. et décroît dès l'automne.

Nous observons que ce cycle existe avec plus ou moins d'amplitude chez les Patelles de Roscoff, de Plymouth, de l'île de Ré et d'Endoume, mais qu'il n'existe probablement pas chez des Gastéropodes voisins qui contiennent d'ailleurs peu de glycérylphosphorylcholine.

Ces variations de la teneur en glycérylphosphorylcholine sont localisées dans le muscle et sont considérables ; pendant la saison froide la glycérylphosphorylcholine n'est en moyenne que de 0,20 mg. par g. pour être supérieure à 7 mg. pendant l'été. Son taux est constant toute l'année dans les viscères.

2) Comme l'élevage de la Patelle ne nous est pas accessible en laboratoire, nous tentons d'expliquer ce phénomène en examinant les différents facteurs susceptibles d'avoir une influence sur la teneur en glycérylphosphorylcholine.

Nous éliminons les conditions de transport et de récolte, ainsi que la sexualité et la croissance ; l'alimentation joue peut-être un rôle, mais le

facteur prépondérant semble être la température. Nous observons qu'il y a parallélisme entre les variations annuelles de la température de l'eau de mer et celles du taux de glycérylphosphorylcholine ; la température de l'atmosphère doit jouer le rôle le plus important.

Nous cherchons à mettre en évidence dans les tissus de la Patelle des corrélations entre les variations saisonnières de la glycérylphosphorylcholine et d'autres métabolites. Les variations du taux de la choline non hydrosoluble dans le muscle, où le cycle annuel est le plus accentué, traduisent peut-être celles de la choline lipidique, variations qui indiqueraient une participation directe des phosphatidylcholines à ce cycle de la glycérylphosphorylcholine.

La constance du taux de la bétaine dans chaque organe au cours de l'année, montre au contraire que cette substance ne doit jouer aucun rôle.

o
o o
o

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ACKERMANN D. et KUTSCHER F., Ztschr. Unters. Nahrungs. Genussm, 1907,
13, 180, 610, 613 ; 14, 637.
- 2- AUGUSTINSSON K.B. et GRAHN M., Acta Chem. Scand., 1953, 7, 906.
- 3- BECKER, Biochem. Ztschr., 1936, 288, 348.
- 4- BLASS J., MACHEBOEUF M. et REBEYROTTE P., Bull. Soc. Chim. biol., 1953, 35, 953.
- 5- BLASS J., LECOMTE O. et POLONOWSKI J., Bull. Soc. Chim. biol., 1954, 36, 627.
- 6- BLASS J., ROUHI A., LECOMTE O. et MACHEBOEUF M., Bull. Soc. Chim. biol., 1953,
9, 559.
- 7- BLOOR W.R., J. Biol. Chem., 1914, 17, 377 ; 1915, 22, 133.
- 8- BLOOR W.R., J. Biol. Chem., 1929, 82, 273.
- 9- BOULAKIA F. et KAHANE E., Bull. Soc. Chim. biol., 1954, 36, 347.
- 10- BOULANGER P. et MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. biol., 1951, 33, 784.
- 11- BRADLEY T.S., Comparative physiology, 1947, 158.
- 12- BREGOFF H.M., ROBERTO E. et DELWICHE C.C., J. Biol. Chem., 1953, 2, 566.
- 13- BRIEGER L., Ztschr. Physiol. Chem., 1887, 11, 184.
- 14- BRUHL J.W., Ber., 1876, 9, 40.
- 15- CARAYON-GENTIL A. et GAUTRELET J., C.R. Soc. biol., 1938, 127, 887.
- 16- CHRISTENSEN N.H., J. Biol. Chem., 1939, 129, 531.
- 17- CLEMENT J., Arch. Sc. Physiol., 1952, 6, 363.
- 18- COTTE J. et KAHANE E., Bull. Soc. Chim., 1950, 17, 639 , 1953, 20, 151.
- 19- CROMWELL B.T. et RENNIE S.D., Bioch. J., 1953, 55, 189.
- 20- DE HEUS J.G., Acta Neerlandia Botanica, 1954, 3, 166.
- 21- DELSAL J.L., Bull. Soc. Chim. biol., 1946, 28, 441.
- 22- DIAMENT M., KAHANE E., LEVY J., C.R. Ac. Sc., 1952, 235, 1058.
- 23- DIAMENT M., Thèse, Paris 1954.
- 24- DODGSON K.S., LEWIS J.I.M. et SPENCER B., Biol. J., 1953, 55, 253 ; 57, 315.
- 25- DUCET G. et KAHANE E., Bull. Soc. Chim. biol., 1946, 28, 794.
- 26- DUCET G., Analyt. Chim. Acta., 1948, 2, 839.
- 27- ETIENNE-PETITFILS J., Bull. Soc. Chim. biol., 1953, 35, 645.

- 28- FISCHER - PIETTE E., Journ. Conchyl., 1939, 83, 303.
- 29- FISCHER - PIETTE E., Journ. Conchyl., 1948, 88, 45.
- 30- FISCHER PH., Vie et Moeurs des Mollusques.
- 31- FLETCHER J.P., BEST CH. et SOLANDT O.M, Bioch. J., 1935, 29, 2278.
- 32- FOLCH J. et VAN SLYKE D.D., J. Biol. Chem., 1939, 129, 539.
- 33- GAUTRELET J., Internationaler Physiologer Kongre (Wien), 27-30 Septembre 1910.
- 34- GEMMILL J.E., Anat. Anzeiger, 1896, 12, 392.
- 35- GOODWIN TW. et TAHA MI., Bioch. J., 1950, 47, 244.
- 36- GUGGENHEIM, Die biogenen Aminen, 1940.
- 37- HANES C.S. et ISHERWOOD F.A., Nature, 1949, 164, 1107.
- 38- HENZE M., Ztschr. Physiol. Chem., 1910, 70, 253 ; 1914, 91, 230.
- 39- HIRSCH C., Acta Chim. Scand., 1944, 90, 106.
- 40- HULTIN T. et HEINE R., Arkiv. Kem. Mineral Geol., 1948, 20, 811.
- 41- HUSEMANN A. et MAIME W., Lieb. Ann. Suppl. , 1862, 2, 383.
- 42- KAHANE E., C.R. Soc. biol., 1929, 101, 109.
- 43- KAHANE E. et KAHANE M., Bull. Soc. Chim., 1931, 49, 557 ; 1936, 3, 621.
- 44- KAHANE E. et COUPECHOUX R., Bull. Soc. Chim., 1936, 3, 1588.
- 45- KAHANE E. et LEVY J., C.R. AC.SC, 1936, 202, 2186 ; Bull. Soc. Chim. biol.,
1937, 19, 959.
- 46- KAHANE E., Bull. Soc. Chim., 1937, 91, 717.
- 47- KAHANE E. et LEVY J., Actualités Scientifiques et industrielles, 1938, 753.
- 48- KAHANE E. et LEVY J., CR.AC.Sc., 1938, 207, 747 ; Bull. Soc. Chim. biol.,
1939, 21, 256.
- 49- KAHANE E. et LEVY J., Bull. Soc. Chim. biol., 1945, 27, 553.
- 50- KAHANE E. et PETITFILS J., Bull. Soc. Chim. biol., 1950, 832, 482.
- 51- KAHANE E. et SIMENAUER A, Bull. Soc. Chim., 1954, 21, 514.
- 52- KAPHAMMER J. et BISCHOFF A., Z. Physiol. Chem., 1930, 191, 179.
- 53- KOFLER L.W., Mikrochemie, 1950, 4, 374.
- 54- KUMAGAWA M. et SUTO K., Bioch. Z., 1908, 8, 212.
- 55- LEA G.H. et RHODES D.N., Bioch. J., 1953, 54, 467.
- 56- LE BRETON E., Bull. Soc. Chim. biol., 1921, 3, 539.
- 57- LAMELAND M.P., Bull. Soc. Chim. biol., 1921, 3, 134 ; 1922, 4, 360.

- 58- LEVINE C. et CHARGAFF E., J. Biol. Chem., 1951, 192, 465.
- 59- LINTZEL W. et FARNIENS, Bioch.Z., 1931, 238, 438.
- 60- LUNEAU, Journ. Pharm. Chim., 1937, 26, 256.
- 61- MACHEBOEUF M., REBEYROTTE P., DUBERT J.M., BRUNEIRE M., Bull. Soc. Chim. biol.,
1953, 35, 334.
- 62- MAC LEAN H., Biol. J., 1912, 6, 355.
- 63- MARUSHIMA Y., J. Bioch (Japan), 1944, 36, 317.
- 64- MII, J. Chem. Soc. (Japan), 1942, 63, 152.
- 65- MILLER C.D., Proc. Pacific. Sc. Congr. Pac. Sc. Ass., 1943, 6, 403.
- 66- MISSON G., Chem. Zeitung, 1908, 32, 635.
- 67- MUNIER R. et MACHEBOEUF M., Bull. Soc. Chim. biol., 1950, 32, 904.
- 68- MUNIER R., Thèse Ing. Docteur, Paris 1950.
- 69- MUNIER R., Chimie Analytique (en cours d'impression).
- 70- ORTON J.H., Nature, 1919, 104, 373.
- 71- ORTON J.H., Journ. mar. Ass., 1928, 15, 851.
- 72- RANZOLI F., Caryologia, 1953, 5, 137.
- 73- REIFER I., J. Sc. Tech., 1940, 22, 111.
- 74- RIEGEL B. STANGER W.D. et WICKHOLM M., J. Biol. Chem., 1949, 177.
- 75- RONOLD O.A. et JAKOBSEN F., J. Soc. Chem. Ind., 1947, 66, 160.
- 76- ROSEN B., Zschr Vergleich. Physiol., 1937, 24, 602.
- 77- SCHEIBLER C., Sahreshb. Unters. Fortschr. Zuckerfabr, 1866, 6, 172 ; Ber.
Dtsch. Chem. Ges., 1869, 2, 292.
- 78- SCHEWAN J.M., J. Sc. Food Agr., 1953, 4, 465.
- 79- SCHMIDT G., HECHT L., FALLOT P., GREENBAUM L. et THANNHAUSER J.J., J. Biol.
Chem., 1952, 197, 601.
- 80- SPERRY W.M. et WEBB M., J. Biol. Chem., 1950, 187, 97.
- 81- STANECK V.L., Ztschr. Zuckerind Bölimen., 1904, 28, 578 ; 1912, 36, 577.
- 82- STOLTZENBERG H., Z. Phys. Chem., 1914, 92, 445.
- 83- STRECHER A., Lieb. Ann., 1849, 70, 149.
- 84- ZUZUCKI U., Chem. Zentr. Bl., 1913, 45, 1042.
- 85- TSUJIMOTO M. et KOYANAGI H., J. Soc. Chem. (Japan), 1934, 37.
- 86- WALKER H.G. SR. et ERLANDER R., Analyt. Chem., 1951, 23, 1309.

- 87- WELSH J. et TAUF R., Biol. Bull., 1948, 95, 346.
88- WIELAND T. et FISCHER E., Naturweiss, 1948, 36, 29.
89- WILHELM K., Zool. An., 1938, 124, 182.
90- WILLSTATTER R., Ber., 1902, 35, 598.

o

o o

o

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	p. 1
<u>CHAPITRE I</u> : Identification de la choline hydrosoluble combinée	p. 5
I - Historique	p. 5
II - Techniques	p. 6
III - C'est un ester de la choline	p. 9
IV - Purification	p. 11
V - Identification	p. 15
<u>CHAPITRE II</u> : La bétaine	p. 24
I - Le reineckate acide de la Patelle	p. 25
II - Le phosphotungstate de la base	p. 28
III - L'iodure de la base	p. 30
IV - L'iodure de bétaine	p. 33
V - Le phosphotungstate de bétaine	p. 35
VI - Le reineckate de bétaine	p. 39
VII - Chromatographie sur papier	p. 40
VIII - Electrophorèse sur papier	p. 43
IX - Taux et localisation de la bétaine dans la Patelle	p. 44
<u>CHAPITRE III</u> : Les substances lipidiques	p. 51
I - Techniques	p. 51
II - Lipides totaux	p. 54
III - Phosphatides	p. 61
<u>CHAPITRE IV</u> : Variations saisonnières des substances choliniques	p. 76
I - Etude des variations de la glycérylphosphorylcholine	p. 76
II - Etude des facteurs externes	p. 82
III - Etude des facteurs internes	p. 82
<u>CONCLUSION</u>	p. 99
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p. 100

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LA CARNITINE, FACTEUR DE CROISSANCE

Vu et approuvé :

Paris, le 5 Juin 1956

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

VU et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

